

PLATELIA™ ASPERGILLUS Ag

1 plate -  96

REF 62794

The Platelia™ *Aspergillus* Ag is an immunoenzymatic sandwich microplate assay for the detection of *Aspergillus galactomannan* antigen in serum and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid



881115 - 2013/10

Approved by

Bio-Rad

Date: 2019-06-28

(Signature)

Name of Responsible Person

Sylvie FERNEX

Stamp



3 Bd Raymond-Poincaré
92430 MARNES-La-COQUETTE - FRANCE

CONTENTS

1- INTENDED USE	3
2- INDICATION FOR USE	3
3- SUMMARY AND EXPLANATION	3
4- PRINCIPAL OF THE PROCEDURE	3
5- REAGENTS	3
6- WARNINGS FOR USERS	5
7- PRECAUTIONS FOR USERS	5
8- REAGENT PREPARATION AND STORAGE	6
9- SPECIMEN COLLECTION	7
10- PROCEDURE	7
11- QUALITY CONTROL (VALIDITY CRITERIA)	9
12- INTERPRETATION OF RESULTS	10
13- LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	12
14- EXPECTED VALUES	13
15- SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS	17
16- BIBLIOGRAPHY	25
17- APPENDIX. INFORMATION FOR IVD MEDICAL DEVICE CIRCULATION IN RUSSIAN FEDERATION	29

• INTENDED USE

The Platelia™ *Aspergillus* Ag is an immunoenzymatic sandwich microplate assay for the detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in adult and pediatric serum samples and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid samples.

The Platelia™ *Aspergillus* Ag is a test which, when used in conjunction with other diagnostic procedures such as microbiological culture, histological examination of biopsy samples and radiographic evidence can be used as an aid in the diagnosis of Invasive Aspergillosis.

• INDICATIONS FOR USE

The Platelia™ *Aspergillus* Ag is an immunoenzymatic sandwich microplate assay for the detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in adult and pediatric serum samples and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid samples.

The Platelia™ *Aspergillus* Ag is a test which, when used in conjunction with other diagnostic procedures such as microbiological culture, histological examination of biopsy samples and radiographic evidence can be used as an aid in the diagnosis of Invasive Aspergillosis.

• SUMMARY AND EXPLANATION

Aspergillus infections usually start in the lung as the port of entry following inhalation of *Aspergillus* spores which are present in the environment. Invasive forms, which have been on the increase for the past 10 years, constitute the most serious infections. They mainly occur in neutropenic patients (following anti-cancer treatment) and in patients treated with immunosuppressants (organ transplantations, particularly bone marrow transplantation) and corticosteroids.

Aspergillus is rarely isolated from blood culture. The diagnosis is often based on nonspecific diagnostic or radiological evidence (clinical symptoms, CT scan, chest x-ray, etc.)

The test for soluble galactomannan antigen in serum appears to be a serological method able to aid in the diagnosis of Invasive Aspergillosis.

In addition, for Solid Organ Transplant recipients, detection of galactomannan antigen in bronchoalveolar lavage (BAL) has proven to be advantageous for the diagnosis of invasive aspergillosis in this population.

• PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

The Platelia™ *Aspergillus* Ag is a one-stage immunoenzymatic sandwich microplate assay which detects galactomannan in human serum and BAL fluid. The assay uses rat EBA-2 monoclonal antibodies, which are directed against *Aspergillus* galactomannan, and have been characterized in previous studies. The monoclonal antibodies are used, (1) to coat the wells of the microplate and bind the antigen, and (2) to detect the antigen bound to the sensitized microplate (conjugate reagent: peroxidase-linked monoclonal antibodies). Serum or BAL fluid samples are heat-treated in the presence of EDTA in order to dissociate immune complexes and to precipitate proteins that could possibly interfere with the test. The treated samples and conjugate are added to the wells coated with monoclonal antibodies, and incubated. A monoclonal antibody - galactomannan monoclonal antibody / peroxidase complex is formed in the presence of galactomannan antigen. The strips are washed to remove any unbound material. Next, the Chromogen TMB solution is added, which will react with the complexes bound to the well to form a blue color reaction. The enzyme reaction is stopped by the addition of acid, which changes the blue color to yellow. The absorbance (optical density) of specimens and controls is determined with a spectrophotometer set at 450 and 620/630 nm wavelength.

• REAGENTS

Platelia™ *Aspergillus* Ag: product No. 62794 (96 Tests)

Store the kit at 2-8°C. Bring all reagents to room temperature (18-25°C) for at least 30 minutes before use. Return all reagents to 2-8°C immediately after use. Return unused strips/plates in pouch and reseal.

Do not remove desiccant. After dilution, working washing solution can be kept for 14 days at 2-30°C. All other reagents except Concentrated Washing Solution (R2) and Stop Solution (R1) should be used within 8 weeks of opening. The Concentrated Washing Solution (R2) and Stop Solution (R10) are stable until expiration after opening. Reagents are supplied in sufficient quantity to perform 96 tests in a maximum of 9 batches.

Component	Contents	Quantity
R1 Microwell Strip Plate	Microplate: - 96 wells (12 strips of 8 wells each) coated with anti-galactomannan monoclonal antibodies - Strip tabs labeled "85"	1 Plate / 12 x 8 Wells
R2 Concentrated Washing Solution (20X)	Concentrated Washing Solution (20X): - Tris NaCl buffer (pH 7.4) - 2% Tween [®] 20 - Preservative: 0.04 % ProClin [™] 300	1 x 70 mL
R3 Negative Control Serum	Negative Control Serum: - Human negative serum - Negative for anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HCV antibodies and HBs Ag - Preservative: 0.3% ProClin [™] 300	2 x 1.7 mL
R4 Cut-off Control Serum	Cut-off Control Serum: - Human serum containing galactomannan - Negative for anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HCV antibodies and HBs Ag - Preservative: 0.3% ProClin [™] 300	2 x 1.7 mL
R5 Positive Control Serum	Positive Control Serum: - Human serum containing galactomannan - Negative for anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HCV antibodies and HBs Ag - Preservative: 0.3% ProClin [™] 300	2 x 1.7 mL
R6 Conjugate	Conjugate (ready to use): - Anti-galactomannan monoclonal antibody / peroxidase labeled - Preservative: 0.3% ProClin [™] 300	1 x 8 mL
R7 Sample Treatment Solution	Sample Treatment Solution (ready to use): - EDTA acid solution	1 x 13 mL
R9 Chromogen: TMB Solution	Chromogen TMB Solution (ready to use): - 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine* (<0.1%) - H ₂ O ₂ (<1.0 %)	1 x 28 mL
R10 Stopping Solution	Stopping Solution (ready to use): - 1 N sulphuric acid solution (H ₂ SO ₄)	1 x 28 mL

*Note TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) is a non-carcinogenic and non-mutagenic chromogen for peroxidase.

i- WARNINGS FOR USERS

1. For *in vitro* diagnostic use.
2. For professional use only.
3. Use of this test kit with samples other than human serum and BAL fluid is not recommended.
4. The Positive Control, Cut-off Control, and Negative Control are manufactured from human serum that has been tested and found to be non-reactive for HBsAg and antibodies to HIV-1, HIV-2 and HC with CE marked tests. However, all reagents should be handled as though capable of transmitting infection. All tests should be conducted in accordance with the OSHA Standard on Bloodborne Pathogens, Biosafety Level 2 or other appropriate biosafety practices.
5. Wear protective clothing, including lab coat, eye/face protection and disposable gloves (synthetic non-latex gloves are recommended) and handle the kit reagents and patient samples with the requisite Good Laboratory Practices. Wash hands thoroughly after performing the test.
6. Do not pipette by mouth.
7. Do not smoke, drink, or eat in areas where specimens or kit reagents are being handled.
8. Avoid splashing samples or solutions.
9. Biological spills not containing acid should be wiped thoroughly with an effective disinfectant. Disinfectants that can be used include (but are not limited to) a solution of 10% bleach (0.5% solution of sodium hypochlorite), 70% ethanol, or 0.5% Wescodyne Plus™. Materials used to wipe up spill may require biohazardous waste disposal.

CAUTION: Do not place solutions containing bleach in the autoclave.

10. Spills containing acid should be appropriately absorbed (wiped up) or neutralized with sodium bicarbonate, and the area rinsed and wiped dry; if it contained biohazardous material, wipe the area with one of the chemical disinfectants.
11. Dispose of all specimens and materials used to perform the test as though they contain an infectious agent. Laboratory chemical and biohazardous wastes must be handled and discarded in accordance with all local, regional and national regulations.
12. For hazard and precaution recommendations related to some chemical components in this test kit please refer to the pictogram(s) mentioned on the labels and the information supplied at the end instruction for use. The Safety Data Sheet is available on www.bio-rad.com.

PRECAUTIONS FOR USERS

1. FROZEN SERUM OR BAL FLUID SAMPLES STORED IN UNKNOWN CONDITIONS MAY GIVE FALSE POSITIVE RESULTS DUE TO CONTAMINATION WITH FUNGUS AND/OR BACTERIA.
2. Do not use kit or any kit reagents after the stated expiration date.
3. Do not mix reagents from other kits that have different lot numbers, with the exception of the Washing Solution (R2, identification*: 20x coloured green), the Chromogen (R9, identification*: TM coloured turquoise) and the Stopping Solution (R10, identification*: 1N coloured red), provided that these reagents are strictly equivalent and that the same lot number is used within a given test run.

*on the vial label

NOTE: The Washing Solution (R2, identified* in green as 20x) may not be mixed with the Washing Solution (R2 identified* in blue as 10X) provided in Bio-Rad reagent kits.

* on the vial label

4. Bring all reagents to room temperature for at least 30 minutes before use.
5. Mix thoroughly every reagent before use.
6. Mix thoroughly the Concentrated Washing Solution (R2) before preparing the Working Washing Solution, exercising care to avoid microbial contamination.
7. Do not conduct the test in the presence of reactive vapors (acids, alkalis, aldehydes) or dust, which could affect the enzymatic activity of the Conjugate.
8. For manual pipetting of controls and specimens, use individual pipette tips to prevent carryover samples.

9. To ensure adequate washing of the wells, comply with the recommended number of wash cycle and ensure that all wells are completely filled and then completely emptied. Washing should not be performed manually with a squeeze bottle.
10. Do not allow the microplate to dry between the end of the wash cycle and addition of reagents.
11. Do not use the same container for the Conjugate and Chromogen TMB Solution.
12. Do not allow Conjugate or Chromogen TMB Solution to come into contact with metal or metallic ions.
13. Avoid exposing the Chromogen TMB Solution to strong light during storage or incubation. Do not allow the chromogen solutions to come into contact with an oxidizing agent.
14. Avoid contact of the Stopping Solution with any oxidizing agent. Do not allow the Stopping Solution to come into contact with metal or metallic ions.
15. Use clean, dust-free materials (tubes, tips, containers, etc.) to minimize the possibility of contamination with *Aspergillus* spores from the environment. Because galactomannan is heat-stable, sterilization material used does not guarantee the absence of contaminating antigen. Pyrogen-free materials are optimal, but standard material can be used with adequate precautions.
16. Limit exposure of solutions (sera, BAL fluid, Sample Treatment Solution, Conjugate) or open containers (plates, tubes, pipettes) to the air.
17. Do not pour any unused Conjugate back into the original container.
18. The Chromogen TMB Solution must be colorless. The appearance of a blue color indicates the reagent is contaminated and should not be used.

REAGENT PREPARATION AND STORAGE

Microwell Strip Plate (R1)

Every frame containing 12 strips is packaged in a pouch. Cut open the pouch using scissors just below the joint. Open the pouch and take out the frame. Put the frame containing the unused strips back in the original pouch. Carefully reseal the pouch and store at +2-8°C.

After the vacuum-packed pouch has been opened, the strips stored at +2-8°C in their original pouch that has been carefully resealed are stable for 8 weeks. Check whether the desiccant is still present.

Washing Solution (R2)

Prepare Working Washing Solution as needed by adding one part Concentrated Washing Solution (R2) to 19 parts deionized or distilled water. The Working Washing Solution can be stored for 14 days at 2-30°C. Prepare a sufficient amount of Working Washing Solution to complete the run (80 mL for one strip: 4 mL R2 + 76 mL distilled water).

After opening, the Concentrated Washing Solution stored at +2-30°C, in the absence of contamination is stable until the expiration date indicated on the label.

Negative Control Serum (R3), Cut-off Control Serum (R4) and Positive Control Serum (R5)
The controls must be heat-treated with the Sample Treatment Solution (R7) as patient specimens, in order to also be a monitor of the treatment.

After opening, these reagents stored at +2-8°C, are stable for 8 weeks, in the absence of contamination.

Conjugate (R6), Sample Treatment Solution (R7), Chromogen: TMB solution (R9)

These reagents are ready to use.

After opening, these reagents stored at +2-8°C are stable for 8 weeks if they are free of contamination.

Stopping reaction (R10)

This reagent is ready to use.

After opening, this reagent stored at +2-8°C is stable until the validity date shown on the label if there is no contamination.

10- SPECIMEN COLLECTION

This test is performed on serum or BAL fluid.

I. SERUM

Collect blood samples according to standard laboratory procedures. Serum samples must be uncontaminated with fungal spores and/or bacteria. Transport and store samples in sealed tube unexposed to air. Unopened samples can be stored at 2-8°C for up to 5 days prior to testing. After initial opening, samples may be stored at 2-8°C for 48 hours prior to testing. For longer storage, store the serum at -70°C.

Serum samples can be subjected to a maximum of 4 freezing / thawing cycles. Previously frozen specimens should be thoroughly mixed after thawing prior to testing.

The results are not affected by samples containing 20 mg/L of bilirubin, lipemic samples containing the equivalent of 2 g/L of triolein (triglyceride) or hemolyzed samples containing 500 mg/dL of hemoglobin. Interferences related to excess albumin have not been tested.

Do not deplete sera.

II. BAL FLUID

Collect BAL fluid samples according to standard laboratory procedures. BAL fluid samples must be collected in sterile saline and may be tested on neat samples (as is) or supernatants from centrifuge samples (10,000 rpm for 10 min) before proceeding to treat the sample per Section 10.

BAL fluid samples must be uncontaminated with fungal spores and/or bacteria. Transport and store samples in sealed tubes, unexposed to air. After initial opening, samples may be stored at 2-8°C for up to 24 hours. For longer storage, store the BAL samples frozen (-20°C or less) up to 5 months.

BAL samples can be subjected to a maximum of 4 freezing/thawing cycles. Previously frozen specimens should be thoroughly mixed after thawing prior to testing.

10- PROCEDURE

Materials provided

See REAGENTS section.

Materials required but not provided

1. Distilled or deionized water, for dilution of Concentrated Washing Solution.
2. Absorbent paper
3. Disposable gloves.
4. Protective glasses.
5. Sodium hypochlorite (bleach) and sodium bicarbonate.
6. Pipettes or multipipettes, adjustable or fixed, to measure and dispense 50 µL, 100 µL, 300 µL, and 1000 µL.
7. 1.5 mL polypropylene microcentrifuge tubes with airtight stoppers, able to support heating to 120°C (heat block) or 100°C (boiling water bath):
 - Screw caps and tubes: 1.5 mL Conical Tubes,OR
 - Snap cap tubes: EZ Micro Test Tubes, 1.5 mL,
 - Micro-tube cap locks, these locks securely seal snap cap tubes by preventing caps from opening during temperature and pressure changes and also allow tubes to be easily lifted out of the block or boiling water bath.
8. Laboratory bench centrifuge for 1.5 mL polypropylene tubes capable of obtaining 10,000g (Brinkman Cat. # 22-36-280-1 or VWR Scientific Cat. # 20901-051 or equivalent).
9. If heat block is used for the treatment of the sera/BAL fluid:
 - Heat block. The following heat block models are recommended:
 - Single block model: Grant Cat. # QBD-1L - outside of the US: Grant Cat. # QBD1 distributed by VWR under Cat. # 460-0074)

- Two block model: Grant Cat. # QBD-2L – outside of the US; Grant Cat. # QBDZ distributed by VWR under Cat. # 460-0076)
- Block for heat blocks: both heat blocks (QBD-1L, QBD1 and QBD-2L, QBD2) must be used with Grant block Cat. # QB-E1 distributed outside of the US by VWR under Cat. # 460-8517

If boiling water is used for the treatment of the sera/BAL fluid:

- Round, floating micro-centrifuge rack for a 1 L beaker (in the US: VWR Scientific Cat. # 60986 100 or Nalgene Cat # 5974-1015 or equivalent).
 - Boiling water bath at 100°C.
10. Vortex agitator.
 11. Microplate incubator at 37 ± 1°C.
 12. Semi-automated or automated microplate washer.
 13. Microplate reader equipped with 450 nm and 620/630 nm filters.

Procedural Comments

Negative, Positive, and Cut-off Controls must be tested on each run to validate the test results.

Treatment of the sera/BAL Fluid

All control sera: negative (R3), cut-off (R4) and positive (R5) must be processed at the same time as serum/BAL fluid samples:

1. Pipette 300 µL of each test serum/BAL fluid and control into individual 1.5 mL polypropylene tube
2. Add 100 µL of Sample Treatment Solution (R7) to each tube.
3. Mix tubes thoroughly by vigorous mixing or vortexing to mix thoroughly. Tightly close the tube prevent opening during heating.

4. Heat block option:

Heat tubes for **6 minutes in a heat block at 120°C**. Tubes must be placed in the block only when the prescribed temperature is reached (*).

OR

Water bath option:

If using a boiling water bath: heat tubes for **3 minutes at 100°C** (*). Tubes must be placed in the water bath only when the prescribed temperature is reached.

5. Carefully remove hot tubes from the heat block or the boiling water bath and place in a centrifuge. Centrifuge tubes at 10,000 x g for 10 minutes. The supernatant is used for the detection of *β*-galactomannan antigen.
6. Test the supernatants using the following procedure. After preparation, the supernatant may be removed and stored at 2-8°C for up to 48 hours prior to testing. If analysis of the results indicates retesting is required, another aliquot of the sample must be treated for testing.

(*) Strict compliance with the prescribed temperature and the prescribed turn-around time as well as use of recommended materials are essential for success of the test.

Do not rely on the temperature displayed by the apparatus, please check that the temperature complies with specifications by using a calibrated thermometer which will be fitted into a tube containing mineral oil: 120°C must be reached inside the tube in a heat block and 100°C in boiling water bath.

EIA Procedure

Strictly comply with the proposed protocol.

Comply with Good Laboratory Practice.

1. Bring reagents to room temperature (+18-25°C) for at least 30 minutes before use.
2. Prepare the Working Washing Solution.
3. Prepare a chart for identification of test sera/BAL fluid Samples and controls in the microplate. Use one well for the Negative Control Serum (R3), two wells for the Cut-off Control Serum (R4), and one well for the Positive Control Serum (R5).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R5	S5	S13									
B	R4	S6										
C	R4	S7										
D	R3	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

4. Remove the plateholder and microwell strips (R1) from the plate pouch. Return any strips that were not be used to the pouch, with the desiccant, and reseal the pouch.
5. Mix the contents of the Conjugate bottle (R6) by inverting before use. Add 50 µL of Conjugate (R6) to each well. Next, add 50 µL of treated serum/BAL supernatant to each well, as designated above. Do not add serum/BAL fluid samples to the wells before the conjugate.
6. **Cover plate with plate sealer**, or other means to prevent evaporation, ensuring that entire surface is covered and watertight.
7. Incubate the microplate in a dry microplate incubator for 90 ± 5 minutes at 37°C (± 1°C).
8. Remove the plate sealer. Aspirate the contents of all wells into a waste container (containing sodium hypochlorite). Wash the plate **5 times with a microplate washer** (using 800 µL of Working Wash Solution). After the last wash, invert the microplate and gently tap on absorbent paper to remove remaining liquid.
9. Rapidly add 200 µL of the Chromogen TMB (R9) Solution to each well, avoiding exposure to bright light.
10. Incubate the microplate in the dark at room temperature (+18-25°C) for 30 ± 5 minutes. **Do not use adhesive film during this incubation step.**
11. Add 100 µL of Stopping Solution (R10) to each well, utilizing the same order for addition of Chromogen TMB Solution. Mix well.
12. Thoroughly wipe the bottoms of each plate.
13. Read the optical density of each well at 450 nm (reference filter of 620/630 nm). Microplates must be read within 30 minutes of addition of Stopping Solution.

1- QUALITY CONTROL (VALIDITY CRITERIA)

Cut-off Control: The O.D. of each Cut-off Control Serum must be ≥ 0.300 and ≤ 0.800 .

Positive Control: The index of the Positive Control Serum must be greater than 1.50.

$$I = \frac{\text{OD Positive Control (R5)}}{\text{Mean Cut-off Control OD}} > 1.50$$

Negative Control: The index of the Negative Control Serum must be less than 0.40.

$$I = \frac{\text{OD Negative Control (R3)}}{\text{Mean Cut-off Control OD}} < 0.40$$

Failure of any of the controls to meet the validity criteria described above renders the assay invalid and patient specimen results should not be reported. The operator may decide to repeat the assay after reviewing the procedure, or may contact the manufacturer for assistance. If a repeat assay is performed, then a new aliquot of the same sample should be used in the repeat assay.

Example Calculation:

Sample	Absorbance (OD)
Negative Control (R3)	0.116
Cut-off Control (R4)	0.513
	0.533
Positive Control (R5)	1.834

Calculations

Mean Cut-off Control Value

To calculate the mean Cut-off Control (R4) OD, add the OD values for each Cut-off Control replicat together and divide the result by 2:

$$(0.513 + 0.533) \div 2 = 0.523$$

Negative Control Index

To calculate the index of the Negative Control, divide the OD of the Negative Control by the mean Cut-off Control OD:

$$I = \frac{0.116}{0.523} = 0.22$$

Positive Control Index

To calculate the index of the Positive Control, divide the OD of the Positive Control by the mean Cut-off Control OD:

$$I = \frac{1.834}{0.523} = 3.51$$

Validity

In the above example:

- Each Cut-off Control OD is ≥ 0.300 and ≤ 0.800 , indicating that the Cut-off Control is valid
- The index of the Negative Control is < 0.40 , indicating that the Negative Control is valid.
- The index of the Positive Control is > 1.50 , indicating that the Positive Control is valid.

The test run in this example is considered to be valid since the results meet the validity criteria for each control.

2- INTERPRETATION OF RESULTS

The presence or absence of galactomannan antigen in the test sample is determined by calculation an index for each patient specimen. The Index (I), is the OD value of the specimen divided by the mean optical density of the wells containing Cut-off Control Serum.

Calculation of the mean Cut-off Control optical density:

Add the optical densities of the two wells containing Cut-off Control Serum (R4) and divide the total by 2.

Calculation of an index (I) for each test sample:

Calculate the following ratio for each test sample:

$$I = \frac{\text{OD sample}}{\text{Mean Cut-off Control OD}}$$

Interpretation of sera/BAL fluid with an index < 0.50 :

Sera/BAL fluid with an index < 0.50 are considered to be negative for galactomannan antigen.

Note: A negative result may indicate that the patient's result is below the detectable level of the assay. Negative results do not rule out the diagnosis of Invasive Aspergillosis. Repeat testing is recommended if the result is negative, but the disease is suspected.

interpretation of sera/BAL fluid with an index ≥ 0.50

Sera/BAL fluid with an Index ≥ 0.50 are considered to be positive for galactomannan antigen.

For all positive patients, it is recommended that a new aliquot of the same sample (serum/BAL) be repeated.

Note: An absorbance value of less than 0.000 may indicate a procedural or instrument error which should be evaluated. That result is invalid and the specimen must be re-run.

Regular screening (twice-weekly) of serum samples of high-risk patients is recommended to increase the sensitivity and early positivity of the test.

Note: The Platelia™ *Aspergillus* Ag is intended to be used as an aid in the diagnosis of Invasive Aspergillosis. Positive results obtained with the Platelia™ *Aspergillus* Ag should be considered in conjunction with other diagnostic procedures such as microbiological culture, histological examination of biopsy samples and radiographic evidence.

Example Calculation:

Sample	Absorbance (OD)
Negative Control (R3)	0.116
Cut-off Control (R4)	0.513
	0.533
Positive Control (R5)	1.834
Patient Sample #1	0.134
Patient Sample #2	0.436
Patient Sample #3	1.196

Calculations

Refer to the Quality Control (Validity Criteria) section for an example of calculations to determine the validity of the assay controls.

Mean Cut-off Control Value

To calculate the mean Cut-off Control (R4) OD, add the OD values for each Cut-off Control replicate together and divide the result by 2.

$$(0.513 + 0.533) \div 2 = 0.523$$

Patient Sample #1

To calculate the index of Patient Sample #1, divide the OD of Patient Sample #1 by the mean Cut-off Control OD:

$$I = \frac{0.134}{0.523} = 0.26$$

In this example, Patient Sample #1 is negative, since the Index of 0.26 is < 0.50 .

Patient Sample #2

To calculate the index of Patient Sample #2, divide the OD of Patient Sample #2 by the mean Cut-off Control OD:

$$I = \frac{0.436}{0.523} = 0.83$$

In this example, Patient Sample #2 is positive, since the Index of 0.83 is ≥ 0.50 .

Patient Sample #3

To calculate the index of Patient Sample #3, divide the OD of Patient Sample #3 by the mean Cut-off Control OD:

$$I = \frac{1.196}{0.523} = 2.29$$

In this example, Patient Sample #3 is positive, since the Index of 2.29 is ≥ 0.50 .

Please refer to Interpretation of Positive Results in Section 12.

3- LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. A negative test from serum and/or BAL samples cannot rule out the diagnosis of Invasive Aspergillosis. Serum samples from patients at risk for Invasive Aspergillosis should be tested twice a week.
2. The Platelia™ *Aspergillus* Ag Procedure and the Interpretation of Results must be followed when testing samples for the presence of galactomannan antigen. The user of the kit is advised to read the package insert carefully prior to conducting the test. In particular, the test procedure must be carefully followed for sample and reagent pipetting, plate washing, and timing of the incubation steps.
3. Failure to add specimen or reagent as instructed in the procedure could result in a falsely negative test. **Repeat testing of additional samples should be considered where there is clinical suspicion of Invasive Aspergillosis or procedural error.**
4. Contamination of negative patient specimen wells by positive control/patient specimen wells is possible if the contents of one well spill over into another well due to rough handling of the microplate or poor pipetting technique while adding reagents.
5. The performance of the Platelia™ *Aspergillus* Ag has not been evaluated with neonatal samples. There is a higher incidence in the number of false positive galactomannan results reported in the European literature in samples from neonatal population^{13, 14, 15}.
6. The Platelia™ *Aspergillus* Ag may exhibit reduced detection of galactomannan in patients with chronic granulomatous disease (CGD) and Job's syndrome¹⁶.
7. The concomitant use of mold-active anti-fungal therapy in some patients with Invasive Aspergillosis may result in reduced sensitivity with the Platelia™ *Aspergillus* Ag^{17, 18}.
8. The Platelia™ *Aspergillus* Ag has not been evaluated for use with plasma or other sample types such as urine or CSF.
9. The performance of the Platelia™ *Aspergillus* Ag has not been established for manual reading and/or visual result determination.
10. Other genera of fungi such as *Penicillium*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Geotrichum* and *Histoplasma* have shown reactivity with rat, EBA-2 monoclonal antibodies used in the assay for the detection of *Aspergillus* galactomannan. Histoplasmosis should be considered in endemic areas including parts of the United States^{30, 32}.
11. Cross-reactivity of BAL fluid samples with *Mycoplasma pneumoniae* or anaesthetic drugs/lubricants used to numb the neck/throat area for the aspiration process has not been evaluated.
12. Positive reactions with no clinical signs:
The following should be considered with regard to the early galactomannan antigen detection in serum or BAL before the appearance of clinical and/or radiological signs. Positive test results without clinical signs are usually observed and they have been shown to correspond to «true positive» test in patients for whom Proven or Probable Invasive Aspergillosis diagnosis is established later on¹⁹. However, in some particular cases, specific factors should be taken into account when interpreting the test:
 - a. Positive test results with no clinical signs have been reported, especially in young children⁴⁴. Although some of these cases could be related to real circulation of *Aspergillus* antigens, most cases can be considered to be false-positives⁷.
 - b. Galactofuranose has been demonstrated in various foods, particularly cereals, cereal products and cream desserts^{1, 11}. Unlike human milk, cow's milk formulas frequently contain high concentrations of galactomannan¹¹. Dietary factors must therefore be taken into account in the interpretation of the course of antigenemia in young children, and more generally in all patients with an altered intestinal barrier^{6, 12}. Any case of positive antigenemia not accompanied by clinical signs should be interpreted even more cautiously in this population of patients.

- c. There have been reports of positive galactomannan test results in patients receiving piperacillin/tazobactam. There have also been reports of certain lots or batches of piperacillin/tazobactam that have been found to be positive for galactomannan antigen. Therefore, positive test result in patients receiving piperacillin/tazobactam should be interpreted cautiously and confirmed by other diagnostic methods. Detection of galactomannan has also been reported in some batches of amoxicillin associated with clavulanic acid parenteral preparations. Therefore, semi-synthetic β -lactam treatments should be taken into account when interpreting the test ^{1 3 32}. Nevertheless, as Platelia™ *Aspergillus* Ag can detect galactomannan antigen well before clinical or radiological signs appear, the occurrence of Invasive Aspergillosis cannot be ruled out. Therefore, patients treated with piperacillin/tazobactam with positive test results should be followed carefully.
- d. Positive reactions in the absence of clinical signs may be observed in patients receiving products containing galactomannan, either parenterally or orally (in the presence of an alteration of the intestinal barrier). The presence of galactomannan in these products can often be explained by the use of a fermentation process based on fungal microorganisms. A positive result will not be observed in a patient, however, unless the serum concentration of exogenous galactomannan reaches or exceeds the test's detection threshold. Thus, if there is a suspicious positive result in the absence of other clinical signs, we recommend investigating the products that the patient is taking and notably their production processes and the origin of the raw materials used ^{44 41 49}.
13. There have been reports of positive reactions for galactomannan in serum and bronchoalveolar lavage fluid associated with PLASMA-LYTE™ have been observed in several studies ^{14 51}. Therefore, any administration of PLASMA-LYTE™ should be taken into account when interpreting the results of this test.
14. The results of the Platelia™ *Aspergillus* Ag in Bronchoalveolar Lavage (BAL) fluid samples from non-immunocompromised patients should be interpreted with caution. ³⁷
15. Results close to the cut-off index value (0.5), should be interpreted cautiously and should be supported by other clinical, radiological or laboratory evidence of invasive aspergillosis since a grey zone is included in the result interpretation of the assay.
16. In addition, results of the Platelia™ *Aspergillus* Ag in Bronchoalveolar Lavage (BAL) fluid samples between 0.5-1.0 index have a lower predictive value than BAL sample results > 1.0 index value; hence the results between 0.5-1.0 index values should be reviewed and supported by other clinical, radiological or laboratory evidence of invasive aspergillosis ^{4 51}.

14- EXPECTED VALUES

1. SERUM

The expected prevalence of Invasive Aspergillosis varies with the patient population; rates from 5-20% have been reported ^{10 4}.

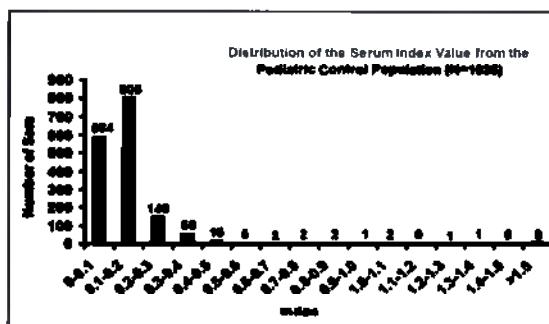
The following results have been obtained from clinical studies conducted on pediatric (age ≤ 21 years) patients in the United States and on adult patients in North America.

A-Pediatrics

A clinical study was conducted on a total of 1954 serum samples from 129 immunocompromised pediatric (Age ≤ 21 years) patients, at high risk for Invasive Aspergillosis (IA) and patients diagnosed with Proven and Probable Invasive Aspergillosis, at three testing centers in the United States to determine the performance characteristics of the Platelia™ *Aspergillus* Ag. The distribution of index values for these populations is shown in the following charts.

Figure 1

A total of 1625* pediatric serum samples obtained from 108 immuno-compromised pediatric patients at three testing centers in the United States were tested to determine the performance characteristics of the Platelia™ Aspergillus Ag. The distribution of index values for samples is shown in the following chart:

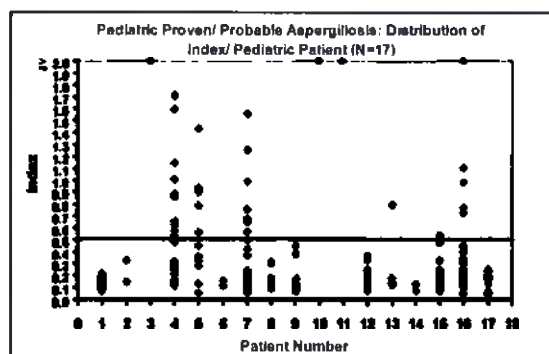


* Note: 80 samples, from 4 control patients with positive galactomannan antigen result coinciding with piperacillin/tazobactam (Zosyn®) therapy were excluded.

Pediatric Patients diagnosed with Invasive Aspergillosis

Figure 2

The scatter plot depicts galactomannan assay results for the 249 serum samples from 17 patients in this study diagnosed with proven or probable Invasive Aspergillosis as defined by EORTC/NIAID definitions. Not every serum sample from each patient is expected to be positive. The expected prevalence of Invasive Aspergillosis varies with the patient population; rates from 5-20% have been reported^{16, 17}. The prevalence rate of this study was 13.6%.



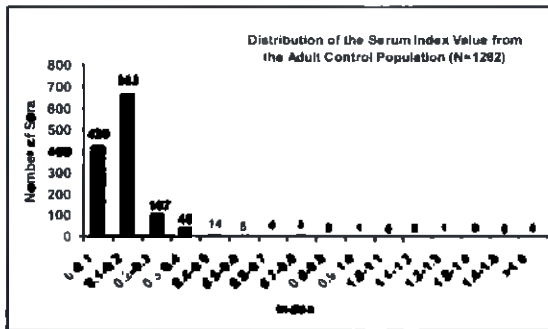
B. Adults

A clinical study was conducted on a total of 1724 serum samples from 172 bone marrow transpla (BMT) and leukemic patients diagnosed with and without Invasive Aspergillosis, at three testing cente in North America to determine the performance characteristics of the Platelia™ *Aspergillus* Ag. TI distribution of index values for these populations is represented in the following charts.

Adult Patients diagnosed without Invasive Aspergillosis (control population)

Figure 3

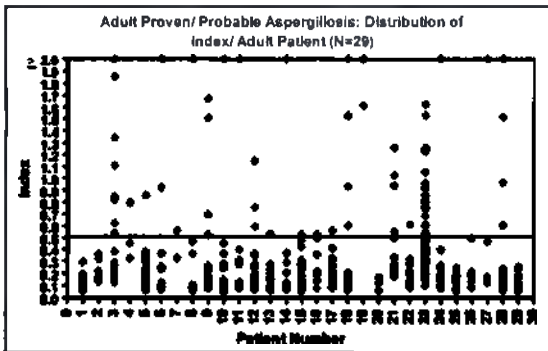
A total of 1262 serum samples obtained from 143 bone marrow transplant (BMT) and leukemic patients at three testing centers in North America were tested with the Platelia™ *Aspergillus* Ag test. The distribution of index values is shown in the following chart.



Adult Patients diagnosed with Invasive Aspergillosis

Figure 4

This scatter plot depicts galactomannan assay results for the 462 serum samples from 29 patients in this study diagnosed with proven or probable Invasive Aspergillosis as defined by EORTC/NIAID definitions. Not every serum sample from each patient is expected to be positive. The expected prevalence of Invasive Aspergillosis varies with the patient population; rates from 5-20% have been reported ^{14, 24}. The prevalence rate for this study was 16.9%.



The following graphs represent examples of a patient without clinical signs or symptoms of Invasive Aspergillosis (negative for *Aspergillus*) and a patient with proven or probable Invasive Aspergillosis (positive for *Aspergillus*) respectively.

Figure 5
Negative patient:

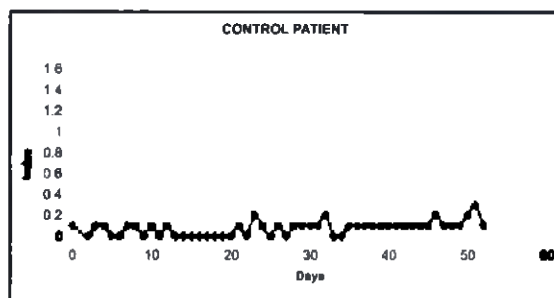
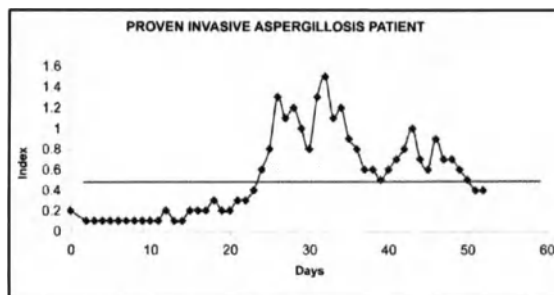


Figure 6
Positive patient:



II. BAL FLUID

Two studies were conducted on a total of 449 BAL samples from 178 Solid Organ transplant (SO) and lung transplant recipients with and without invasive aspergillosis in the United States to determine the performance characteristics of the Platelia™ *Aspergillus* Ag kit with Bronchoalveolar Lavage Fluid samples.

Of these, there were 403 BAL samples from 167 solid organ and lung transplant recipients without invasive aspergillosis.

In addition, a retrospective analysis was performed on BAL samples from 99 evaluable high risk haematology patients in a study outside the United States which included 58 patients with proven probable invasive aspergillosis.

Expected values in BAL samples from the combined SOT and lung transplant recipients without Invasive Aspergillosis are presented in the table below. Results are presented by samples from transplant recipients with and without mold colonization.

Table 1

Expected Values by Sample

Combined SOT and Lung Transplant Recipients without Invasive Aspergillosis

N =403 BAL Fluids

Diagnosis	N	Positive (%)	Negative (%)
Controls without colonization	341	11/341 (3.2%)	330/341 (96.8%)
Controls with colonization	62	12/62 (19.4%)	50/62 (80.6%)
Control Total	403	23/403 (5.7%)	380/403 (94.3%)

Expected values in BAL samples from the combined SOT and lung transplant recipients without Invasive Aspergillosis are presented by transplant type in the table below.

Table 2

Expected Values by Sample

Combined SOT and Lung Transplant Recipients without Invasive Aspergillosis By Transplant Type

N =403 BAL Fluids

Transplant Type	N	Positive (%)	Negative (%)
Heart	28	3/28 (10.7%)	25/28 (89.3%)
Kidney	25	3/25 (12.0%)	22/25 (88.0%)
Liver	23	1/23 (4.3%)	22/23 (95.7%)
Lung	327	16/327 (4.9%)	311/327 (95.1%)
Control Total	403	23/403 (5.7%)	380/403 (94.3%)

Expected values were also evaluated in a total of 41 BAL fluid samples from 41 hematological disease patients without Invasive Aspergillosis and are presented in the Table below

Table 3

Expected Values by Sample

Hematologic disease patients without Invasive Aspergillosis

N =41 BAL Fluids

Diagnosis	N	Positive (%)	Negative (%)
Control	41	8/41 (19.5%)	33/41 (80.5%)

15. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A. REPRODUCIBILITY

a) Reproducibility Studies In Serum

Inter-assay and Intra-assay variability for the Platelia™ *Aspergillus* Ag were determined in a study using a panel of 6 pooled patient serum samples (one negative, one low positive, two positive and two high positive) obtained at three clinical trial sites in North America. Each of the 6 panel members were tested in triplicate (x3) on 3 different days, on one lot, at two sites (total number of replicates at each site = 9). Each of the 6 panel members was tested in duplicate (x2) on different days, on 1 lot, at a third site (total number of replicates at the third site = 6). One (operator performed all precision testing at each site. The data were analyzed according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)). The mean optical density (OD) and mean index value, standard deviation (SD), percent coefficient of variation (%CV), within run precision (intraassay) and within site (inter-assay) precision for each panel member at each site are illustrated below in the following tables.

Site 1

Panel Member	Neg		Low Pos		Pos #1		Pos #2		High Pos#1		High Pos #2		Neg Control		CO Control		Pos Control	
	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	3	3	6	6	3	3
Mean	0.052	0.09	0.445	0.74	0.702	1.17	0.931	1.563	1.227	2.06	2.887	4.83	0.046	0.08	0.606	1.00	2.216	3.67
Within Run (intra-assay) ¹ SD	0.002	0.00	0.022	0.03	0.059	0.09	0.044	0.08	0.051	0.09	0.085	0.17	N/A	N/A	0.02	0.03	N/A	N/A
%CV	N/A	N/A	4.8%	4.4%	8.4%	7.6%	4.7%	5.1%	4.2%	4.4%	3.1%	3.6%	N/A	N/A	3.7%	3.4%	N/A	N/A
Total (inter-assay) ² SD	0.036	0.04	0.051	0.08	0.070	0.14	0.044	0.25	0.058	0.29	0.169	0.58	N/A	N/A	0.102	0.03	0.317	0.12
%CV	N/A	N/A	11.5%	10.4%	10.0%	11.6%	4.7%	15.7%	4.7%	14.3%	5.9%	11.9%	N/A	N/A	16.9%	2.8%	14.3%	3.3%

Site 2

Panel Member	Neg		Low Pos		Pos #1		Pos #2		High Pos#1		High Pos #2		Neg Control		CO Control		Pos Control	
	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	3	3	6	6	3	3
Mean	0.040	0.10	0.280	0.70	0.364	0.89	0.602	1.49	0.801	2.01	1.361	3.43	0.074	0.18	0.415	1.00	1.197	2.97
Within Run (intra-assay) ¹ SD	0.006	0.01	0.041	0.09	0.023	0.07	0.045	0.11	0.046	0.10	0.047	0.11	N/A	N/A	0.00	0.01	N/A	N/A
%CV	N/A	N/A	14.5%	13.0%	6.4%	7.6%	7.5%	7.1%	5.7%	4.8%	3.5%	3.2%	N/A	N/A	1.1%	1.1%	N/A	N/A
Total (inter-assay) ² SD	0.006	0.03	0.058	0.19	0.083	0.18	0.057	0.28	0.042	0.53	0.079	1.00	N/A	N/A	0.094	0.01	0.068	0.54
%CV	N/A	N/A	20.8%	27.0%	22.7%	19.8%	9.5%	18.7%	5.3%	26.5%	5.8%	29.2%	N/A	N/A	22.7%	0.9%	5.7%	18.2%

Site 3

Panel Member	Neg		Low Pos		Pos #1		Pos #2		High Pos#1		High Pos #2		Neg Control		CO Control		Pos Control	
	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	3	3	6	6	3	3
Mean	0.049	0.10	0.388	0.81	0.652	1.36	0.830	1.73	1.158	2.41	2.378	4.96	0.059	0.12	0.480	1.00	1.652	3.45
Within Run (intra-assay) ¹ SD	0.003	0.01	0.009	0.02	0.062	0.17	0.068	0.14	0.094	0.20	0.126	0.25	N/A	N/A	0.028	0.06	N/A	N/A
%CV	N/A	N/A	2.4%	2.4%	12.5%	12.2%	8.2%	8.2%	8.1%	8.2%	5.3%	5.1%	N/A	N/A	5.8%	5.8%	N/A	N/A
Total (inter-assay) ² SD	0.012	0.03	0.078	0.13	0.068	0.15	0.104	0.25	0.082	0.15	0.111	0.34	N/A	N/A	0.028	0.04	0.056	0.23
%CV	N/A	N/A	20.0%	15.8%	10.5%	11.1%	12.5%	14.3%	7.1%	6.2%	4.7%	6.8%	N/A	N/A	5.8%	4.1%	3.4%	6.6%

N/A = not applicable

¹NCCLS EP5-A, Vol. 19, No. 2, Page 24, Equation (C2)

²NCCLS EP5-A, Vol. 19, No. 2, Page 25, Equation (C3) and Equation (C4)

b) Reproducibility in BAL Fluid

Inter-assay and Intra-assay variability for the Platelia™ *Aspergillus* Ag were determined in a study using a panel of 4 pooled patient BAL samples spiked with purified galactomannan (one negative, one high negative, one low positive and one medium positive) at 3 testing sites (Two US clinical testing sites and one internal site). Each of the 4 panel members and the controls were tested in duplicate (x2) in 2 runs per day on 5 different days on one lot (Total number of results at each site = 120). Two (2) operators performed all precision testing at each site. The data was analyzed according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). The mean optical density (OD) and mean index value, standard deviation (SD), percent coefficient variation (%CV), within run precision (intra-assay) and within site (inter-assay) precision for each panel member are illustrated below in the following table:

Table 5 - Combined Sites Summary

Summary		Negative		High Negative		Low Positive		Medium Positive		Positive Control		Negative Control	
		N=60		N=60		N=60		N=60		N=60		N=60	
		OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index	OD	Index
Mean		0.121	0.29	0.214	0.50	0.375	0.88	0.575	1.35	1.580	3.72	0.047	0.11
Within Run (Intra Assay)	SD	N/A	N/A	0.037	0.103	0.035	0.078%	0.029	0.067	0.111	0.265	N/A	N/A
	%CV	N/A	N/A	17.4%	20.5%	9.3%	8.9%	5.0%	5.0%	7.0%	7.1%	N/A	N/A
Total (Inter Assay)	SD	N/A	N/A	0.042	0.095	0.061	0.122	0.070	0.138	0.190	0.438	N/A	N/A
	%CV	N/A	N/A	19.6%	18.9%	16.2%	13.9%	12.2%	10.2%	12.0%	11.8%	N/A	N/A

B. CROSS REACTIVITY

A study to evaluate the effect of potentially interfering medical conditions unrelated to Invasive Aspergillosis was performed with one lot of the Platelia™ *Aspergillus* Ag kit. The following serum samples were tested for cross-reactivity with the Platelia™ *Aspergillus* Ag. A total of 151 sera were tested.

Table 6

Pathology	# Samples Tested	# Positives
Rheumatoid Factor	10	0
ANA Positive	10	0
IgG Hypergammaglobulinemia	10	0
IgM Hypergammaglobulinemia	10	0
Cancer*	11	0
Non-Viral Cirrhosis (primary biliary; alcohol induced; drug induced)	10	0
Multiple Transfusions	10	0
Multiparous Females	10	0
HAV	10	0
HCV	10	0
Rubella	10	0
CMV	10	0
Syphilis (RPR+)	10	0
Toxoplasmosis	10	0
Mycoplasma	10	0

* One each of bladder, breast (2), colon, endometrial, lung, prostate, renal, and squamous (3)

C. CLINICAL TESTING

Clinical studies in North America

I. SERUM SAMPLES

Clinical testing to evaluate the sensitivity, specificity, and predictive value of the Platelia Aspergillus Ag was conducted on pediatric (age ≤ 21 years) patients at three sites located in the United States and on adult patients at three sites located in North America. The studies were conducted using a total of 1954 serum samples collected from 129 pediatric patients and a total of 1724 serum samples collected from 172 adult patients from the following populations*:

- Patients without signs of Invasive Aspergillosis (control patients)
- Patients with Probable Invasive Aspergillosis
- Patients with Proven Invasive Aspergillosis

* The Invasive Fungal Infection Cooperative Group (IFICG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Mycosis Study Group (MSG) of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) in 2002 have defined criteria for diagnosis of Invasive Aspergillosis (IA) in patients with hematologic malignancy or hematopoietic stem cell transplant.²

SENSITIVITY

A. Pediatrics

Results from this study have been analyzed in terms of patient sensitivity. Sensitivity testing was conducted using the Platelia™ Aspergillus Ag at three sites on a combined total of 17 immunocompromised pediatric patients diagnosed with Proven or Probable Invasive Aspergillosis.

Table 7

Diagnosis	Number of patients	Sensitivity	95% Confidence Interval
Proven Aspergillosis	9	44.4% (4/9)	18.9-73.3%
Probable Aspergillosis	8	62.5% (5/8)	30.6-86.3%
Combined Proven and Probable Aspergillosis	17*	52.9% (9/17)	31.0-73.8%

**Note: 8 of the 17 patients gave negative Aspergillus galactomannan antigen results. All of the patients with negative Aspergillus galactomannan antigen results received therapy with multiple antifungal agents. The concomitant use of mold-active anti-fungal therapy in some patients with Invasive Aspergillosis may result in reduced sensitivity.*

B. Adults

Sensitivity testing was conducted using the Platelia™ Aspergillus Ag at three sites on a combined total of 29 Bone Marrow Transplant (BMT) and Leukemia adult patients diagnosed with Proven or Probable Invasive Aspergillosis.

Table 8

Diagnosis	Number of patients	Sensitivity	95% Confidence Interval
Proven Aspergillosis	11	81.8% (9/11)	52.3-94.9%
Probable Aspergillosis	18	77.8% (14/18)	54.8-91.0%
Combined Proven and Probable Aspergillosis	29	79.3% (23/29)	61.6-90.2%

SPECIFICITY

A. Pediatrics

Specificity by pediatric patients

Specificity testing was conducted using the Platelia™ *Aspergillus* Ag at three sites on a combined total of 108* immunocompromised pediatric patients without signs of Invasive Aspergillosis (control patients).

Table 9

Site	Number of patients	Specificity	95% Confidence Interval
1	44	86.4 % (38/44)	73.3-93.6%
2	59	86.4 % (51/59)	75.5-93.0%
3	5	100% (5/5)	56.6-100%
Combined Sites	108	87.0% (94/108)	79.4-92.1%

***Note: 4 patients with positive galactomannan antigen results coinciding with piperacillin / tazobactam therapy were excluded.**

Specificity by pediatric samples

Specificity testing was conducted using the Platelia™ *Aspergillus* Ag at three sites on a combined total of 1625* samples obtained from 108 immunocompromised pediatric patients without signs of Invasive Aspergillosis (control patients).

Table 10

Site	Number of patients	Specificity	95% Confidence Interval
1	794	98.9% (785/794)	97.9-99.4%
2	731	97.8% (715/731)	96.5-98.6%
3	100	100% (100/100)	96.3-100%
Combined Sites	1625	98.5% (1600/1625)	97.7-99.0%

***Note: 80 samples from 4 patients with positive galactomannan antigen results coinciding with piperacillin / tazobactam therapy were excluded.**

B. Adults

Specificity by adult patients

Specificity testing was conducted using the Platelia™ *Aspergillus* Ag at three sites on a combined total of 143 Bone Marrow Transplant (BMT) and Leukemia adult patients without signs of Invasive Aspergillosis (control patients).

Table 11

Site	Number of patients	Specificity	95% Confidence Interval
1	28	78.6% (22/28)	60.5-89.8%
2	77	93.4% (71/77)	84.0-96.4%
3	38	89.5% (34/38)	75.9-95.8%
Combined Sites	143	88.8% (127/143)	82.6-93.0%

Specificity by adult samples

Specificity testing was conducted using the Platelia™ *Aspergillus* Ag at three sites on a combined total of 1262 samples obtained from 143 Bone Marrow Transplant (BMT) and Leukemia adult patients without signs of Invasive Aspergillosis (control patients)

Table 12

Site	Number of samples	Specificity	95% Confidence Interval
1	349	98.0% (342/349)	95.9-99.0%
2	560	98.6% (552/560)	97.2-99.3%
3	353	98.9% (349/353)	97.1-99.6%
Combined Sites	1262	98.5% (1243/1262)	97.7-99.0%

PREDICTIVE VALUE

Positive and negative predictive values have been analyzed for the patient population in this study. Based on the actual average of 13.6% prevalence rate in pediatrics and 16.9% prevalence rate in adults observed in this study, positive and negative predictive values have been calculated as below:

A. Pediatrics

Study Prevalence 13.6%

PPV: 39.1% 95% Confidence Interval: 22.2-59.2%

NPV: 92.2% 95% Confidence Interval: 85.3-96.0%

B. Adults

Study Prevalence 16.9%

PPV: 59.0% 95% Confidence Interval: 43.4-72.9%

NPV: 95.5% 95% Confidence Interval: 90.5-97.9%

The expected prevalence of Invasive Aspergillosis varies with the patient population; rates from 5-20% have been reported. For patient populations on the lower end of the published prevalence, if positive and negative predictive values have been re-calculated using a 5% prevalence rate.

A. Pediatrics

Calculated Prevalence 5%

PPV: 17.6% 95% Confidence Interval: 6.5-39.8%

NPV: 97.2% 95% Confidence Interval: 92.1-99.1%

B. Adults

Calculated Prevalence 5%

PPV: 27.2% 95% Confidence interval: 13.7-46.7%

NPV: 98.8% 95% Confidence Interval: 95.4-99.7%

II. BAL FLUID SAMPLES- PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity and specificity of the Platelia™ *Aspergillus* Ag with BAL fluid samples were evaluated in two studies in the United States on 116 samples from 62 solid organ transplant recipients and 333 samples from 116 lung transplant recipients and one study outside the United States on 99 samples from 99 high risk hematology patients with and without invasive aspergillosis.

A. Sensitivity

Sensitivity was evaluated in Solid Organ Transplant and Lung Transplant recipients diagnosed with invasive aspergillosis as well as hematologic disease patients diagnosed with invasive aspergillosis according to the EORTC/MSG criteria.

I. Solid Organ Transplant recipients with invasive Aspergillosis

Of the total of 116 samples from 62 solid organ transplant recipients in one study, sensitivity was evaluated in 5 recipients diagnosed with invasive aspergillosis as shown in the table below.

Table 13

Sensitivity with Platelia™ Aspergillus Ag

Proven or Probable Invasive Aspergillosis in Solid Organ Transplant Recipients By Patient

Diagnosis	N	Index ≥ 0.5	Sensitivity	95% Confidence Interval
Proven Aspergillosis	2	2	2/2 (100%)	34.2 - 100%
Probable Aspergillosis	3	3	3/3 (100%)	43.8 - 100%
Combined Proven and Probable Aspergillosis	5	5	5/5 (100%)	56.5 - 100%

Table 14

Sensitivity with Platelia™ Aspergillus Ag

Proven or Probable Invasive Aspergillosis in Solid Organ Transplant Recipients By Transplant Type

Transplant Type	N	Index ≥ 0.5	Sensitivity	95% Confidence Interval
Heart	1	1	1/1 (100%)	20.6 - 100%
Kidney	3	3	3/3 (100%)	43.8 - 100%
Liver	1	1	1/1 (100%)	20.6 - 100%
Total	5	5	5/5 (100%)	56.5 - 100%

II. Lung Transplant recipients with invasive aspergillosis

Of the total of 333 samples from 116 lung transplant recipients in another study, sensitivity was evaluated in 6 recipients diagnosed with invasive aspergillosis as shown in the table below.

Table 15

Sensitivity with Platelia™ Aspergillus Ag

Proven or Probable Invasive Aspergillosis in Lung Transplant Recipients By patient

Diagnosis	N	Index ≥ 0.5	Sensitivity	95% Confidence Interval
Proven Aspergillosis	2	1	1/2 (50.0%)	9.4 - 90.6%
Probable Aspergillosis	4	3	3/4 (75.0%)	30.0 - 95.4%
Combined Proven and Probable Aspergillosis	6	4	4/6 (66.7%)	30.0 - 90.3%

III. Hematologic disease patients with invasive aspergillosis

Sensitivity was also evaluated in a third study in 58 samples from 58 hematologic disease patients diagnosed with invasive aspergillosis as shown in the table below. In the study a retrospective analysis was performed on BAL samples from high risk hematology patients using the Platelia™ *Aspergillus* EI. The data from this published study below was evaluated to establish the performance characteristics of the Platelia™ *Aspergillus* EIA on BAL fluid. ¹⁴

Table 16

Proven or Probable Invasive Aspergillosis in Hematologic Disease Patients

Diagnosis	N	Index ≥ 0.5	Sensitivity	95% Confidence Interval
Proven Aspergillosis	31	31	31/31 (100%)	89.0 - 100%
Probable Aspergillosis	27	26	26/27 (96.3%)	81.7 - 99.3%
Combined Proven and Probable Aspergillosis	58	57	57/58 (98.3%)	90.8 - 99.7%

B. Specificity

Specificity was evaluated in a total of 98 BAL samples from 57 SOT recipients and 305 BAL samples from 110 Lung Transplant recipients without invasive aspergillosis and is shown in the table below. Results are presented by samples from transplant recipients with and without mold colonization:

Table 17

Specificity by Sample

Combined SOT and Lung Transplant Recipients without Invasive Aspergillosis

N = 403 BAL Fluids

Diagnosis	N	Index < 0.5	Negative (%)	95% Confidence Interval
Controls without colonization	341	330	330/341 (96.8%)	94.3 - 98.2%
Controls with colonization	62	50	50/62 (80.6%)	69.1 - 88.6%
Control Total	403	380	380/403 (94.3%)	91.6 - 96.2%

Specificity in BAL samples from the combined SOT and lung transplant recipients without Invasive Aspergillosis is presented by transplant type in the table 18 below:

Table 18

Specificity by Sample

Combined SOT and Lung Transplant Recipients without Invasive Aspergillosis By Transplant Type

N = 403 BAL Fluids

Transplant Type	N	Index < 0.5	Negative (%)	95% Confidence Interval
Heart	28	25	25/28 (89.3%)	72.8 - 96.3%
Kidney	25	22	22/25 (88.0%)	70.0 - 95.8%
Liver	23	22	22/23 (95.7%)	79.0 - 99.2%
Lung	327	311	311/327 (95.1%)	92.2 - 97.0%
Total	403	380	380/403 (94.3%)	91.6 - 96.2%

Specificity was also evaluated in a total of 41 BAL samples from 41 hematologic disease patients without invasive aspergillosis and is shown in the table below.

Table 19

Specificity by Sample

Hematologic Disease Patients without Invasive Aspergillosis

N= 41

Diagnosis	N	Index < 0.5	Negative (%)	95% Confidence Interval
Control Patients	41	33	33/41 (80.5%)	66.0 – 89.8%

6- BIBLIOGRAPHY

1. Ansorg, R., R. Van Den Boom, and P.M. Rath. 1997. Detection of *Aspergillus galactomannan* antigen in foods and antibiotics. *Mycoses* 40 : p. 353-7.
2. Ascloglu, S., J. H. Rex, B. De Pauw, J. E. Bennett, J. Bille, F. Crokaert, D. W. Dennin, J. P. Donnelly, J. E. Edwards, Z. Erjavec, D. Fiere, O. Lortholary, J. Maertens, J. F. Mei, T. F. Patterson, J. Ritter, D. Selleslag, P. M. Shah, D. A. Stevens and T. J. Walsh. 2000. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer or hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin. Infect. Dis.* 34: p. 7-14.
3. Aubry, A., R. Porcher, J. Bottero, S. Touratier, T. Leblanc, B. Brethon, P. Rousselot, E. Raffou, J. Menotti, F. Derouin, P. Ribaud and A. Sulahian. 2006. Occurrence and Kinetics of False-Positive *Aspergillus* Galactomannan Test Results following Treatment with β -Lactam Antibiotics in Patients with Hematological Disorders. *J. Clin. Microbiol.* 44: p. 389-394.
4. Barnes P. D. and K. A. Marr. 2007. Risks, diagnosis and outcomes of invasive fungal infections: hematopoietic stem cell transplant recipients. *Brit. Journ. Haematol.* 139: p. 519-531.
5. Becker M. J., E. J. Lugtenburg, J. J. Cornelissen, C. V.D. Schee, H. C. Hoogsteden and D. Marie. 2003. Galactomannan detection in computerized tomography-based broncho-alveolar lavage fluid and serum in hematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Br. Haematol.* 121(3): p. 448-457.
6. Blijlevens, N. M., J. P. Donnelly, J. F. Meis, P. E. Verweij, and B. E. De Pauw. 2002. *Aspergillus* galactomannan antigen levels in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients given total parenteral nutrition. *Transpl. Infect. Dis.* 4: p. 64-65.
7. Chambon-Pautas, C., J. M. Costa, M.T. Chaumette, C. Cordonnier, and S. Bretagne. 2007. Galactomannan and polymerase chain reaction for the diagnosis of primary digestive aspergillosis in a patient with acute myeloid leukaemia. *J. Infect.* 43: p. 213-214.
8. Clancy C., R. A. Jaber, H. L. Leather, J. R. Wingard, B. Staley, J. L. Wheat, C. Cline, K. H. Ran, D. Schain, M. Baz and M. H. Nyugen. 2007. Bronchoalveolar Lavage Galactomannan in Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis among Solid-Organ Transplant Recipients. *J. Clin. Microbiol.* 45(6): p. 1759-1765.
9. De Repentigny, L., L. Kaufman, G. T. Cole, D. Kruse, J. P. Latge, and R. C. Matthews. 1999. Immunodiagnosis of Invasive Fungal Infections. *J. Med. Vet. Mycol.* 32: p. 239-252.
10. Denning, D. W. 1998. Invasive Aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* 26: p. 781-803.
11. Desai R, L.A. Ross and J. A. Hoffman. Poster AAA 2008. The Role of Bronchoalveolar Lavage Galactomannan Assay in the Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Pediatric Populations.
12. Erjavec, Z. and P. E. Verweij. 2002. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. *Drug Resist. Updat.* 5: p.3-10.
13. Gangneux, J., D. Lavarde, S. Bretagne, C. Guiguen and V. Gandemer. 2002. Transient *Aspergillus* antigenaemia: think of milk. *Lancet.* 359(9313):1251.
14. Hage, C. A., J. M. Reynolds, M. Durkin, L. J. Wheat, K. S. Knox. 2007. Plasmalyte as a Cause of false-positive results for *Aspergillus* galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid. *J. Clin. Microbiol.* 45: p. 676-677.

15. Herbrecht, R., v. Lerscher-Bru, C., Uprea, B., Lioure, J., Waller, F., Campos, U., Villard, R., L. Liu, S., Natarajan-Ame, P., Lutz, P., Dufour, J. P., Bergerat, and E. Candolfi. 2002. *Aspergillus* galactomannan detection in the diagnosis of Invasive Aspergillosis in cancer patients. J Clin. Onco 20: p. 1898-1906.
16. Herbrecht, R., D. Denning, T. Patterson, J. Bennett, R. Greene, J. Oestmann, W. Kern, K. Mai, P. Ribaud, O. Lortholary, R. Sylvester, R. Rubin, J. Wingard, P. Stark, C. Durand, D. Callik, E. Thiel, P. Chandrasekar, M. Hodges, H. Schlamm, P. Troke, B. DePauw. 2002. Voriconazole Versus Amphotericin B for Primary Therapy of Invasive Aspergillosis. N Engl J Med. 347, 6: p. 408-415.
17. Hussain S., D.L. Paterson, S. M. Studer, M. Crespo, J. Pilewski, M. Durkin, J.L. Wheat, B. Johnson, L. McLaughlin, C. Bentsen, K. McCurry and N. Singh. 2007. *Aspergillus* Galactomannan Antigen in the Bronchoalveolar Lavage Fluid for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Lung Transplant Recipients. Transplantation 83(10): p. 1330-1336.
18. Hussain S., C. J. Clancy, M.H. Nyugen, S. Swartzentruber, H. Leather, A. M. LeMont, M.M. Durkin, K. S. Knox, C. A. Hage, C. Bentsen, N. Singh, J.R. Wingard and L.J. Wheat. 2008. Performance Characteristics of the Platelia™ *Aspergillus* AG for detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in bronchoalveolar lavage fluid. Clin. Vaccine Immunol. 15(12): p. 1760-1763.
19. Khan ZU, Ahmad S, and Theyyathel AM. 2008. Detection of *Aspergillus fumigatus*-specific DN. (1-3)-beta-D-glucan and galactomannan in serum and bronchoalveolar lavage specimens experimentally infected rats. Mycoses; 51: p. 129-35.
20. Klont R.R., M.A.S.H. Mennink-Kersten and P. E. Verweij. 2004. Utility of *Aspergillus* Antigen Detection in Specimens Other than Serum Specimens. Clin. Infect. Diseases. 39: p. 1467-74.
21. Knox KS, Rose AS, and Hage CA. 2007. Rapid Fungal Diagnosis: The Utility of Bronchoalveolar Lavage for Pneumocystis and Endemic Mycoses. Current Fungal Infection Reports; 1: p. 153-8.
22. Kwak EJ and Nyugen MH. 2008. Galactomannan Detection in Bronchoalveolar Lavage Fluid. Current Fungal Infection Reports; 2: p. 206-213.
23. Latge, J. P. 1995. Tools and trends in the detection of *Aspergillus fumigatus*. Curr Top Med Mycol 6: p. 245-281.
24. Latge, J. P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. Clin Microbiol Rev 12[2]: 310-50.
25. Latge, J. P., H. Kobayashi, J. P. Debeauvais, M. Diaquin, J. Sarfati, J. M. Wieruszski, E. Parra, J. P. Bouchara, and B. Fournet. 1994. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. Infect. Immun. 62: p. 5424-5433.
26. Letscher-Bru, V., A. Cavalier, E. Pernot-Marino, H. Koenig, D. Eyer, J. Waller and E. Candolfi. 1998. Recherche d'antigène galactomannane aspergillaire circulant par Platelia™ *Aspergillus* antigenémies positives persistantes en l'absence d'infection. J. Med. Mycol. 8:p. 112-113.
27. Maertens, J., J. Verhaegen, H. Demuynck, P. Brock, G. Verhoef, P. Vandenberghe, J. V. Eldere, L. Verbist, and M. Boogaerts. 1999. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay in hematological patients at risk for invasive Aspergillosis. J. Clin. Microbiol. 37: p. 3223-3228.
28. Maertens, J., J. Verhaegen, K. Lagrou, J. Van Eldere, and M. Boogaerts. 2001. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for Invasive Aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. Blood 97: p. 1604-1610.
29. Maertens, J., V. Maertens, K. Theunissen, W. Meersseman, P. Meersseman, S. Meer, E. Verbeken, G. Verhoef, J. V. Eldere and K. Lagrou. 2009. Bronchoalveolar Lavage Fluid Galactomannan for the Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Patients with Hematologic Diseases. Clin. Infect. Diseases. 49: 1688-93.
30. Marr K. A., S. A. Balajee, L. McLaughlin, M. Tabouret, C. Bentsen and T.J. Walsh. 2004. Detection of Galactomannan Antigenemia by Enzyme Immunoassay for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis: Variables That Affect Performance. J. Infect. Dis. 190: 641-9.
31. Marr K. A., M. Laverdiere, A. Gugel and W. Leisenring. 2005. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. Clin. Infect. Dis 40: p. 1762-9.
32. Mattei, D., D. Rapezzi, N. Mordini, F. Cuda, C. Lo Nigro, M. Musso, A. Amelli, S. Cagnassi, and A. Gallamini. 2004. False-positive *Aspergillus* galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay results in vivo during amoxicillin-clavulanic acid treatment. J. Clin. Microbiol. 42: p. 5362-5363.

33. Mennink-Kersten M. A. S. H., D. Kuegebrink, K. Klont, A. Warris, H. J. M. Op den Camp and F. Verweij. 2005 Bifidobacterial Lipoglycan as a New Cause for False-Positive Platelia™ *Aspergillus* Enzyme Immunoabsorbent Assay Reactivity. J. Clin. Microbiol. 43(8): 3925-3931.
34. Meersseman W., K. Lagrou, J. Maertens, A. Wilmer, G. Hermans, S. Vanderschueren, I. Spré E. Verbeken and E. V. Wijngaerden. 2008 *galactomannan* in Bronchoalveolar Lavage Fluid. Am. Respi. Cnt. Care Med 177: p. 27-34.
35. Musher B., D. Fredericks, W. Leisenring, S. A. Balajee, C. Smith and K. Marr. 2004 *Aspergillus galactomannan* Enzyme Immunoassay and Quantitative PCR for Diagnosis of Invasive Aspergillosis with Bronchoalveolar Lavage Fluid. J. Clin. Microbiol. 42(12): p. 5517-5522
36. Nareddy, S., P. H. Chandrasekar. 2008. False-positive *Aspergillus galactomannan* (GM) assay histoplasmosis. J. Infection 56: p. 80-81.
37. Nguyen MH, R. Jaber, H.L. Leather, J. R. Wingard, B. Staley, L. J. Wheat, C. L. Cline, M. Ba K.H. Rand and C. J. Clancy. 2007 Use of bronchoalveolar lavage to detect *galactomannan* for diagnosis of pulmonary aspergillosis among nonimmunocompromised hosts. J Clin Microbiol 45:2787-92.
38. Patterson D. L. and N. Singh. 1999. Invasive Aspergillosis in Transplant Recipients. Medicine. 78(1): p. 123-38.
39. Pauw B.D., Walsh T. J., Donnelly J. P., Stevens D.A., Edwards J. E., Calandra T., Pappas P. G. Maertens J., Lortholary O., Kauffman C. A., Denning D.W., Patterson T.F., Maschmeyer G., Bil J., Dismukes W.E., Herbrecht R., Hope W. W., Kibbler C.C., Kulberg B. J., Marr K. A., Munk P., Odds F. C., Perfect J. R., Restrepo A., Ruhnke M., Segal M., Segal B. H., Sobel J. D., Soré T.C., Viscoli C., Wingard J.R., Zaoutis T. and J.E. Bennett. 2008 Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG Consensus Group). Clin Infectious Disease 46, p. 1813-1821.
40. Penack O., P. Rempf, B. Graf, I. W. Blau and E. Thiel. 2008 *Aspergillus galactomannan* testing patients with long-term neutropenia: implications for clinical management. Ann Oncol. 19(5): p. 984-9, Epub 2008.
41. Racil, Z., I. Kocmanova, M. Lengerova, J. Winterova, J. Mayer. 2007 Intravenous PLASMA-LYT as a Major Cause of False-Positive Results of Platelia™ *Aspergillus* Test for *galactomannan* Detection in Serum. J. Clin. Microbiol. 45(2): p. 3141-3142
42. Salonen J., O-P. Lehtonen, M-R Terasjarvi and J. Nikoskelainen. 2000. *Aspergillus* Antigen in Serum, Urine and Bronchoalveolar Lavage Specimens of Neutropenic Patients in Relation to Clinical Outcome. Scand J. Infect. Dis. 32: p.485-490.
43. Sanguinetti M., B. Posteraro, L. Pagano, G. Pagliari, L. Fianchi, L. Mele, M. L. Sorda, A. Francini and G. Fadda. 2003. Comparison of Real-Time PCR, Conventional PCR, and *galactomannan* Antigen Detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples from Hematology Patients for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. J. Clin. Microbiol. 41(4): p.3922-3925.
44. Siemann M., M. Koch-Dorfler and M. Gaude 1998 False-positive results in premature infants with the Platelia™ *Aspergillus* sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay Mycoses. 41(9-10): p. 373-7.
45. Stynen, D., A. Goris, J. Sarfati, and J. P. Latge. 1995. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with Invasive Aspergillosis. J.Clin. Microbiol. 33: p. 497-500.
46. Stynen, D., J. Sarfati, A. Goris, M. C. Prevost, M. Lesourd, H. Kamphuis, V. Darras, and J. P. Latge. 1992. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus galactomannan*. Infect.Immun. 60: p. 2237-2245.
47. Sulahian, A., F. Boutboul, P. Ribaud, T. Leblanc, C. Lacroix, and F. Derouin. 2001 Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of Invasive Aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. Cancer 91: p. 311-318.

48. Sulianian, A., M. Tabouret, P. Ribaud, J. Sarrati, E. Gluckman, J. P. Latge, and F. Derouin. 1999. Comparison of an enzyme immunoassay and latex agglutination test for detection of *galactomanna* in the diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15: p. 139-145.
49. Surmont, J., W. Stockman. 2007. Gluconate-containing intravenous solutions: Another cause false-positive *galactomannan* assay reactivity. *J. Clin. Microbiol.* 45: p. 1373.
50. Swanink, C. M., J. F. Meis, A. J. Rijs, J. P. Donnelly, and P. E. Verweij. 1997. Specificity of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus galactomannan*. *J. Clin. Microbiol.* 35: p. 257-260.
51. Upton A., A. Gugel, W. Leisenring, A. Limaye, B. Alexander, R. Hayden and K. Marr. 2005. Reproducibility of Low *galactomannan* Enzyme Immunoassay Index Values Tested in Multiple Laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 43: p. 4796-4800.
52. Verdaguer V., T. J. Walsh, W. Hope and K. Cortez. 2007. *galactomannan* antigen detection in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 7(1):p. 21-32.
53. Verweij, P. E., E. C. Dompeling, J. P. Donnelly, A. V. Schattenberg, and J. F. Meis. 1997. Serial monitoring of *Aspergillus* antigen in the early diagnosis of Invasive Aspergillosis. Preliminary investigations with two examples. *Infection* 25: p. 86-89.
54. Verweij, P. E. and J. F. Meis. 2000. Microbiological diagnosis of Invasive Fungal Infections transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis.* 2: p. 80-87.
55. Verweij, P. E., D. Stynen, A. J. Rijs, B. E. de Pauw, J. A. Hoogkamp -Korstanje, and J. F. Meis. 1995. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing Invasive Aspergillosis in immunocompromised patients. *J. Clin. Microbiol.* 33: p. 1912-1914.
56. Verweij, P. E., C. M. Weemaes, J. H. Curfs, S. Bretagne, J. F. Meis. 2000. Failure to detect circulating *Aspergillus* markers in a patient with chronic granulomatous disease and Invasive Aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 38: p. 3900-3901.
57. Verweij P., J-P Latge, A. J. J. M. Rijs, W. J. G. Melchers, B. E. D. Pauw, J. A. A. Hoogkamp Korstanje. 1995. Comparison of Antigen Detection and PCR Assay Using Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosing Invasive Pulmonary Aspergillosis in Patients Receiving Treatment for Hematological Malignancies. *J. Clin. Microbiol.* 33(12): p. 3150-3153.
58. Walsh T. J., R.L. Schaufele, T. Sein, J. Gea-Banacloche, M. Bishop, N. Young, R. Childs, J. Barrett, H. L. Malech, and S.M. Holland. 2002. Reduced expression of *galactomannan* antigenem in patients with Invasive Aspergillosis and chronic granulomatous disease or Job's syndrome. Abstracts of the 40th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America. Arlington, V. P. 105; Abstr. 345.
59. Wheat, L. J., E. Hackett, M. Durkin, P. Connolly, R. Petraitiene, T. J. Walsh, K. Knox, C. Hage. 2007. Histoplasmosis-associated cross-reactivity in the Bio-Rad Platelia™ *Aspergillus* enzyme immunoassay. *Clin. Vaccine Immunol.* 14 (5): p. 638-40.
60. Wheat J.L., A. M. Monte, M.M. Durkin, S.L. Swartzentruber, K.K. Knox, C.A. Hage, C. Bentse S. Husain, N. Singh, C.J. Clancy, M.H. Nyugen. AAA 2008. Poster Detection of *Aspergillus galactomannan* in BAL in the Platelia *Aspergillus* AG, as performed at MiraVista Diagnostics. <http://www.miravistalabs.com> Site verified June 9, 2008.
61. Wheat J. and T.J. Walsh. 2008. Diagnosis of Invasive Aspergillosis by *galactomannan* Antigenemia Detection using an enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 27:245-51.
62. Yeo, S. F. and B. Wong. 2002. Current Status of Nonculture Methods for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: p. 465-484.

(EN) • This product contains human or animal components. Handle with care.

(RU) • Этот продукт содержит компоненты человеческого или животного происхождения. Обращаться с осторожностью



H314 - H317

P280 - P305+P351+P338 - P301+P330+P331 -
P303+P361+P353 - P333+P313 - P501

(EN)

Danger

Causes severe skin burns and eye damage. May cause an allergic skin reaction.

Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. IF SWALLOWED: rinse mouth. Do NOT induce vomiting. IF ON SKIN (or hair): Remove/Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower. If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

(RU)

Опасно!

Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждение глаз. Может вызывать аллергическую реакцию кожи.

Наденьте защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / защиту для лица. ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промойте глаза водой, в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы, если они надеты и это легко сделать. Продолжайте промывать глаза. ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: Прополощите рот. НЕ вызывайте рвоту. ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (ВОЛОСЫ): Снимите/удалите немедленно всю загрязненную одежду. Промойте участки кожи водой. При возникновении раздражения или появления сыпи Обратитесь к врачу. Утилизируйте содержимое/упаковку в соответствии с местными / региональными / национальными / международными правилами.

NOTES

Blank lined area for notes.

Blank lined area for notes.

Blank lined area for notes.

Blank lined area for notes.

Distributed in the U.S. by:
Bio-Rad Laboratories
6565 185th Avenue NE
Redmond, WA 98052

Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette France
Tel. : +33 (0) 1 47 95 60 00
Fax.: +33 (0) 1 47 41 91 33
 **www.bio-rad.com**



2013/10
881115

For Customer Orders and Technical Service Call: 1-800-2-BIO-RAD (1-800-224-6723)

17- APPENDIX. Information for medical device circulation in Russian Federation.

Kit of the Reagents Platelia Aspergillus Ag for detection of Aspergillus galactomannan antigen in serum and bronchoalveolar lavage (BAL) by enzyme immunoassay.

Additional information to item 10:

The release of the kit during the Quality Control is determined on:

- the control panel of positive sera (Panel de Controle Aspergillus Ag) containing galactomannan antigen of Aspergillus, as the percentage of samples defined by the kit as positive, and makes 100%.
- the control panel of negative sera (Panel de Controle Aspergillus Ag) not containing the galactomannan antigen Aspergillus, as a percentage of samples defined by the kit as negative, and makes 100%.

17.1 Shipping

The product should be transported by all kinds of covered vehicles according with the rules applicable to this type of vehicle at 2-8 °C. The product should be transported in its original packaging, which protects against external influences. Loading and unloading and transportation should strictly comply with requirements of handling marks printed on the packaging labels and on the transport packaging labels.

Do not use this medical device if transport and storage conditions are not met!

17.2 Storage

Store the kit at 2-8°C in the refrigerator or cold room in original packaging during the entire shelf life.

After opening, the reagents should be stored in tightly closed packages in the refrigerator or cold room at 2 - 8 ° C within 8 weeks.

17.3. Disposal

This product must be handled and discarded in accordance with all local, regional and national regulations. All parts of this medical device, any samples and materials used and produced in the performance of tests, including expired reagents should be disposed in accordance with SanPiN 2.1.7.2790-10 as potentially infectious medical waste (class B).

17.4. Warranty

The manufacturer warrants constant product characteristics stated in the documentation when the product is used in accordance with the IFU and for its intended purpose specified by the manufacturer.

For all questions, complaints, and support please, contact manufacturer's authorized representative on the territory of the Russian Federation:

LLC Bio-Rad laboratorii

Address: 117105, Russian Federation, Moscow, Nizhny Susalny pereulok, 5, bld, 5A.

Phone: +7 (495) 721-14-04

E-mail: diag_support_rcis@bio-rad.com

<http://www.bio-rad.com>

Sylvie FERNEZ
Regulatory Affairs Manager

Vu pour certification
matérielle de la signature
de M. Alain FERNET
apposée ci-dessous
PARIS, le 23-07-2019
Cette certification de signature(s) ne peut être
inscrite sur un document au présent document. Le
caractère d'un acte authentique
La responsabilité du Notaire ne peut à aucun
titre être mise en cause, ni en ce qui concerne le
contenu du présent document.



BIO RAD
3 Bd Raymond-Poincaré
92430 MARNES-La-COQUETTE - FRANCE

PLATELIA ASPERGILLUS Ag

1 микропланшет -  96

62794

Набор реагентов Platelia Aspergillus Ag для выявления галактоманнанового антигена Aspergillus в сыворотке и бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) методом иммуноферментного анализа.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



881115 - 2013/10

Одобрено
Био-Рад (Bio-Rad)
Дата: 2019-06-28
(Подпись)
Имя ответственного лица
Сильвия Фернез
(Подпись)
Штамп

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	3
2. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ	3
3. ОБЗОР И ОБЪЯСНЕНИЕ	3
4. ПРИНЦИП МЕТОДА ⁴⁵	3
5. РЕАГЕНТЫ.....	4
6. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ.....	5
7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ	6
8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ	7
9. ЗАБОР ОБРАЗЦОВ	8
10. МЕТОДИКА.....	8
11. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА (КРИТЕРИИ ВАЛИДАЦИИ)	11
12. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	12
13. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА	14
14. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ	15
15. ОТДЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ	19
16. БИБЛИОГРАФИЯ.....	29
17. ПРИЛОЖЕНИЕ Информация для обращения медицинского изделия на территории РФ	36

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Для выявления галактоманнанового антигена *Aspergillus* в сыворотке и бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) методом иммуноферментного анализа.

Используется в диагностике инвазивного аспергиллеза у взрослых и детей совместно с другими диагностическими процедурами, такими как микробиологическое культивирование, гистологическое исследование биоптатов и рентгеновское исследование.

2. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов Platelia *Aspergillus* Ag для выявления галактоманнанового антигена *Aspergillus* в сыворотке и бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) методом иммуноферментного анализа, используется в диагностике инвазивного аспергиллеза у взрослых и детей совместно с другими диагностическими процедурами, такими как микробиологическое культивирование, гистологическое исследование биоптатов и рентгеновское исследование.

3. ОБЗОР И ОБЪЯСНЕНИЕ

Аспергиллезная инфекция обычно начинается в легких, где происходит вдыхание спор грибка *Aspergillus* из окружающей среды. Инвазивные формы, количество которых увеличилось за прошедшие 10 лет, представляют самые опасные инфекции. Они, в основном, встречаются у пациентов с нейтропенией (после противоопухолевой терапии) или после приема иммунодепрессантов (после пересадки органов, особенно костного мозга) или кортикостероидов¹⁰.

Aspergillus редко выделяют из гемокультуры. Диагноз часто основывается на неспецифических диагностических или рентгенологических признаках (клинических симптомах, данных КТ, рентгенограмме грудной клетки и т. д.).

Тест на растворимый галактоманнановый антиген представляет собой серологический метод, облегчающий диагностику инвазивного аспергиллеза^{9, 12, 23, 54, 62}.

Кроме того, у реципиентов трансплантатов паренхиматозных органов доказана польза выявления галактоманнанового антигена в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) при диагностике инвазивного аспергиллеза^{8, 17, 18}.

4. ПРИНЦИП МЕТОДА⁴⁵

Набор реагентов Platelia *Aspergillus* Ag для выявления галактоманнанового антигена *Aspergillus* в сыворотке и бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) методом иммуноферментного анализа это одностадийный тест на основе микропланшета. В тесте используются крысинные моноклональные антитела ЕВА-2 против галактоманнана грибов *Aspergillus*, описанные в ранее проведенных исследованиях^{25, 46}. Моноклональные антитела используются для (1) покрытия лунок микропланшета и связывания антигена и (2) выявления антигенов, связанных с сенсibilизированным микропланшетом (конъюгат: меченые пероксидазой моноклональные антитела). Образцы сыворотки или БАЛ нагревают в присутствии ЭДТА для разрушения иммунных комплексов и осаждения белков, потенциально способных исказить результат²⁴. Обработанные образцы и конъюгат добавляют в лунки, покрытые моноклональными антителами и инкубируют. В присутствии галактоманнанового антигена формируется комплекс моноклональное антитело + галактоманнан + моноклональное антитело/пероксидаза. Стрипы отмывают от несвязанного материала. Затем добавляют раствор хромогена ТМБ, реагирующего со связанными комплексами с образованием синего окрашивания. Ферментативную реакцию останавливают добавлением кислоты, меняющей синее окрашивание на желтое. Поглощение (оптическую плотность) образцов и контроля определяют с помощью спектрофотометра при длине волны 450 и 620/630 нм.

5. РЕАГЕНТЫ

Platelia Aspergillus Ag, номер по каталогу 62794 (96 тестов)

Храните набор при 2–8°C. Перед началом использования выдержите все реагенты при комнатной температуре (18–25°C) **не менее чем 30 мин.** Немедленно после использования поместите все реагенты в холодильник (2–8°C). Поместите неиспользованные стрипы/планшеты обратно в пакет и запечатайте его.

Не вынимайте влагопоглотитель. После разведения раствор для промывки можно хранить в течение 14 дней при 2–30°C. Все остальные реагенты, кроме концентрированного раствора для промывки (R2) и останавливающего раствора (R10) можно хранить в течение 8 недель после вскрытия. Раствор для промывки (R2) и останавливающий раствор (R10) после вскрытия стабильны до истечения срока годности. Реагенты поставляются в количестве, достаточном для проведения 96 тестов не более в чем 9 сериях.

Компонент		Состав	Кол-во
R1	Стрипованный микропланшет с микролунками (Microplate)	Микропланшет 96 лунок (12 стрипов по 8 лунок), покрытых моноклональными антителами к галактоманнану; маркировка стрипов «85».	1 планшет/12x8 лунок
R2	Концентрированный раствор для промывки (20x) (Concentrated Washing Solution (20X))	Концентрированный раствор для промывки (20x) буферный раствор (трис + NaCl) с pH 7,4; 2% Tween® 20; Консервант: 0,04% ProClin™ 300.	1x70 мл
R3	Отрицательная контрольная сыворотка (Negative Control Serum)	Отрицательная контрольная сыворотка отрицательная человеческая сыворотка; не содержит антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С и HBsAg; консервант: 0,3% ProClin™ 300.	2x1,7 мл
R4	Контрольная сыворотка критического значения (Cut-off Control Serum)	Контрольная сыворотка критического значения человеческая сыворотка, содержащая галактоманнан; не содержит антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С и HBsAg; консервант: 0,3% ProClin™ 300.	2x1,7 мл
R5	Положительная контрольная сыворотка (Positive Control Serum)	Положительная контрольная сыворотка человеческая сыворотка, содержащая галактоманнан; не содержит антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С и HBsAg;	2x1,7 мл

		консервант: 0,3% ProClin™ 300.	
R6	Конъюгат (Conjugate)	Конъюгат (готовый) меченые пероксидазой антитела к галактоманнану; консервант: 0,3% ProClin™ 300.	1x8 мл
R7	Раствор для обработки образцов (Sample Treatment Solution)	Раствор для обработки образцов (готовый) кислотный раствор ЭДТА.	1x13 мл
R9	Раствор хромогена ТМБ (Chromogen TMB Solution)	Раствор хромогена ТМБ (готовый) 3,3',5,5'-тетраметилбензидин* (<0,1%); H ₂ O ₂ (<1,0%).	1x28 мл
R10	Останавливающий раствор (Stopping Solution)	Останавливающий раствор (готовый) раствор серной кислоты (H ₂ SO ₄), 1 моль/л.	1x28 мл

***Примечание.** ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) – неканцерогенный и немутагенный хромоген, взаимодействующий с пероксидазой.

6. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

1. Только для диагностики in vitro.
2. Только для профессионального использования.
3. Не рекомендуется использовать набор реагентов с образцами, отличными от сыворотки или БАЛ человека.
4. Положительная контрольная сыворотка, контрольная сыворотка критического значения и отрицательная контрольная сыворотка производятся из человеческой сыворотки, проверенной на отсутствие антигена HBs и антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и вирусу гепатита С с помощью тестов, отмеченных знаком CE. Однако со всеми реагентами следует обращаться как со способными передавать трансмиссивные инфекции. Все анализы должны проводиться в соответствии с требованиями стандарта OSHA по обращению с гемоконтактными патогенами, 2 уровень Biosafety или другими подходящими мерами обеспечения биологической безопасности.
5. Используйте средства защиты, включая лабораторный халат, средства защиты глаз/лица и одноразовые перчатки (рекомендуется использовать перчатки из синтетических материалов, а не латекса). Следует обращаться с реагентами набора и образцами согласно надлежащей лабораторной практике. После проведения теста тщательно вымыть руки.
6. Не пипетируйте ртом.
7. Не курить, не пить и не принимать пищу в помещениях, где работают с образцами или с реагентами из набора.
8. Избегать разливания образцов или растворов.
9. Пролитые образцы и растворы содержащие биологические материалы, не содержащие кислоты, тщательно смывают эффективным дезинфицирующим средством. Допустимы к использованию дезинфицирующие средства, в состав которых может входить (но не ограничивается) 10% хлорная известь (0,5% раствор гипохлорита натрия), 70% этанол или 0,5% Wescodyne Plus™. Для

материалов, используемых для удаления загрязнений, может потребоваться утилизация как для биологически опасных отходов.

ОСТОРОЖНО! Не автоклавируйте растворы, содержащие хлорную известь и растворы гипохлорита натрия

10. Пролитые образцы и растворы содержащие биологические материалы, содержащих кислоты, удаляют или нейтрализуют гидрокарбонатом натрия, промывают и протирают насухо. При содержании биологически опасного материала обработайте поверхность одним из химических дезинфектантов.
11. Все образцы и материалы, использованные в тесте, утилизируют как содержащие возбудитель заболевания. С химическими и представляющими биологическую опасность отходами обращаются и утилизируют согласно местным, региональным и национальным законам.
12. Для определения рисков и мер предосторожности, связанных с использованием некоторых химических компонентов данного набора, пожалуйста, обратитесь к специальным символам на этикетках и информации, предоставленной в конце инструкции по использованию. Паспорт безопасности доступен на веб-сайте www.bio-rad.com.

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

1. **ЗАМОРОЖЕННЫЕ ОБРАЗЦЫ СЫВОРОТКИ ИЛИ БАЛ, ХРАНИВШИЕСЯ В НЕИЗВЕСТНЫХ УСЛОВИЯХ, МОГУТ ДАВАТЬ ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ ВСЛЕДСТВИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ГРИБАМИ И/ИЛИ БАКТЕРИЯМИ.**
2. Запрещается использовать набор или любые его компоненты после истечения указанного срока годности.
3. Не смешивайте реагенты из разных наборов с разными номерами серий, за исключением раствора для промывки (R2, 20х, помечен зеленым*), хромогена (R9, ТМБ, помечен бирюзовым*) и останавливающего раствора (R10, помечен* 1N красным), при условии строгой эквивалентности реагентов и использования при каждом проведении теста реагентов из одной серии.

*на этикетке флакона

ПРИМЕЧАНИЕ. Запрещается смешивать раствор для промывки (R2, 20х, помечен зеленым*) с раствором для промывки (R2, 10х, помечен синим*) из наборов реагентов Bio-Rad.

*на этикетке флакона

4. **Перед использованием выдержите все реагенты при комнатной температуре (18–25°C) не менее чем 30 мин**
5. Перед использованием тщательно взболтайте каждый реагент.
6. Тщательно взболтайте концентрированный раствор для промывки (R2) перед приготовлением рабочего раствора для промывки, соблюдая осторожность во избежание микробного загрязнения.
7. Запрещается проводить тест в присутствии активных паров (кислот, щелочей, альдегидов) или пыли, способной повлиять на ферментативную активность конъюгата.
8. Во избежание контаминации используйте отдельные наконечники пипеток при переносе вручную контроля и образцов.
9. Для надлежащей промывки соблюдайте рекомендуемое число циклов и следите за тем, чтобы лунки полностью наполнялись и полностью опустошались. Запрещается проводить промывку вручную с помощью бутылки-пульверизатора.

10. Не допускайте высыхания микропланшета в промежуток между завершением цикла промывки и добавлением реагентов.
11. Запрещается наливать конъюгат и раствор хромогена ТМБ в одну емкость.
12. Не допускайте контакта конъюгата или раствора хромогена ТМБ с металлом или ионами металлов.
13. Не допускайте воздействия интенсивного света на раствор хромогена ТМБ при хранении или инкубации. Не допускайте контакта растворов хромогена с окислителями.
14. Не допускайте контакта останавливающего раствора с любыми окислителями. Не допускайте контакта останавливающего раствора с металлом или ионами металлов.
15. Для уменьшения вероятности загрязнения спорами *Aspergillus* из окружающей среды используйте чистые материалы, очищенные от пыли (пробирки, наконечники, емкости и т. д.). Т. к. галактоманнан устойчив к нагреванию, стерилизация материалов не гарантирует отсутствия загрязнения. Оптимально использование материалов, не содержащих пирогены, но при достаточных мерах предосторожности можно использовать стандартные материалы.
16. Ограничивайте контакт растворов (сывороток, БАЛ, раствора для обработки образцов, конъюгата) и открытых емкостей (планшетов, пробирок, пипеток) с воздухом.
17. Не сливайте неиспользованный конъюгат в исходную емкость.
18. Раствор хромогена ТМБ должен быть бесцветным. Появление синего окрашивания свидетельствует о загрязнении и непригодности реагента.

8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Стрипованный микропланшет с микролунками (R1)

Каждая рамка содержит 12 стрипов и упакована в пакет. Вскройте пакет ножницами ниже шва. Откройте пакет и выньте рамку. Рамку с неиспользованными стрипами верните обратно в пакет. **Осторожно запечатайте пакет** и храните при 2–8°C.

После вскрытия вакуумной упаковки стрипы хранят при 2–8°C в исходном пакете, который аккуратно запечатывают, в течение 8 недель. Убедитесь, что влагопоглотитель по-прежнему находится в пакете.

Концентрированный раствор для промывки (R2)

Нужное количество рабочего раствора для промывки готовят путем добавления 1 части концентрированного раствора для промывки (R2) к 19 частям деионизированной или дистиллированной воды. Рабочий раствор для промывки можно хранить в течение 14 дней при температуре 2–30°C. Готовят количество раствора, достаточное для проведения теста (80 мл на каждый стрип: 4 мл R2 + 76 мл дистиллированной воды).

При отсутствии загрязнений открытый концентрированный раствор для промывки можно хранить при 2–30°C до истечения указанного на этикетке срока годности.

Отрицательная контрольная сыворотка (R3), контрольная сыворотка критического значения (R4) и положительная контрольная сыворотка (R5)

Контрольные сыворотки нагревают с раствором для обработки образцов (R7), как и образцы пациентов.

При отсутствии загрязнений открытые реагенты можно хранить при 2–8°C в течение 8 недель.

Конъюгат (R6), раствор для обработки образцов (R7) и раствор хромогена ТМБ (R9)

Реагенты готовы к использованию.

При отсутствии загрязнений открытые реагенты можно хранить при 2–8°C в течение 8 недель.

Останавливающий раствор (R10)

Реагент готов к использованию.

При отсутствии загрязнений открытый реагент можно хранить при 2–8°C в течение 8 недель.

9. ЗАБОР ОБРАЗЦОВ

Тест проводят с сывороткой или БАЛ.

I. СЫВОРОТКА

Проводят забор проб крови согласно стандартным лабораторным процедурам. Образцы сыворотки не должны содержать спор грибов и/или бактерий. Образцы транспортируют и хранят в герметично закрытых пробирках, без доступа воздуха. Закрытые образцы можно хранить при 2–8°C в течение до 5 дней перед тестом. Открытые образцы можно хранить при 2–8°C в течение 48 часов перед тестом. Длительное хранение сыворотки возможно при -70°C.

Возможно исследование сыворотки, прошедшей не более 4 циклов заморозки/разморозки. Замороженные образцы после размораживания тщательно перемешивают перед проведением теста.

Результаты не искажаются при содержании в образцах 20 мг/л билирубина, липемии, эквивалентной 2 г/л триолеина (глицерина триолеата), или гемолизе с содержанием 500 мг/дл гемоглобина. Влияние на тест избыточного содержания альбуминов не исследовалось.

Не декомплентируйте сыворотку.

II. БАЛ

Проводят забор проб БАЛ согласно стандартным лабораторным процедурам. Образцы БАЛ хранят в стерильном физиологическом растворе, также, возможно тестирование чистых образцов (как есть) или надосадочной жидкости после их центрифугирования (10 000 g в течение 10 мин) до проведения обработки согласно разделу 10.

Образцы БАЛ не должны содержать спор грибов и/или бактерий. Образцы транспортируют и хранят в герметично закрытых пробирках, без доступа воздуха. Открытые образцы можно хранить при 2–8°C в течение не более 24 часов. Длительное хранение БАЛ (до 5 месяцев) возможно при -20°C и ниже.

Возможно исследование БАЛ, после не более 4 циклов заморозки/разморозки. Замороженные образцы после размораживания тщательно перемешивают перед проведением теста.

10. МЕТОДИКА

Поставляемые материалы

См. раздел «Реагенты».

Необходимые материалы, не входящие в комплект поставки

1. Дистиллированная или деионизированная вода для разведения концентрированного раствора для промывки.
2. Фильтровальная бумага.
3. Одноразовые перчатки.
4. Защитные очки.
5. Гипохлорит натрия (хлорная известь) и гидрокарбонат натрия.
6. Пипетки или мультипипетки, регулируемые или неподвижные, для измерения и переноса 50, 100, 300 и 1000 мкл жидкости.

7. Полипропиленовые микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с герметичными пробками, выдерживающие нагревание до 120°C (термоблок) или 100°C (кипящая водяная баня)
 - винтовые крышки и пробирки: конические пробирки объемом 1,5 мл;
 - пробирки с защелкивающимися колпачками EZ Micro объемом 1,5 мл;
 - дополнительные фиксаторы для крышек микропробирок, они надежно фиксируют защелкивающиеся колпачки на пробирках, не давая им открываться при изменении температуры и давления, а также позволяют легко вынимать пробирки из термоблока или водяной бани.
 8. Лабораторная настольная центрифуга для полипропиленовых пробирок объемом 1,5 мл способная обеспечить 10 000 g (Brinkman номер по каталогу 22-36-280-1 или VWR Scientific номер по каталогу 20901-0591 или аналогичная).
 9. При использовании термоблока для нагревания сывороток/БАЛ
 - термоблок, рекомендуются модели:
 - одноклочная модель Grant номер по каталогу QBD-1L, за пределами США – Grant номер по каталогу QBD1, VWR номер по каталогу № 460-0074;
 - двухклочная модель Grant номер по каталогу QBD-2L, за пределами США – Grant номер по каталогу QBD2, VWR номер по каталогу № 460-0076;
 - оба термоблока (QBD-1L, QBD1 и QBD-2L, QBD2) используются с блоком Grant (номер по каталогу QB-E1), продаваемым за пределами США компанией VWR номер по каталогу 460-8517.
- При использовании водяной бани для нагревания сывороток/БАЛ**
- круглый плавающий штатив микроцентрифуги для стакана емкостью 1 л (в США VWR Scientific номер по каталогу 60986-100, Naglene номер по каталогу 5974-1015 или аналогичный);
 - кипящая водяная баня с температурой 100°C.
10. Устройство для перемешивания реагентов (типа Вортекс).
 11. Инкубатор для микропланшетов с температурой 37±1°C.
 12. Полуавтоматическая или автоматическая мойка для микропланшетов (**вошер**).
 13. Считывающее устройство для микропланшетов с фильтрами для длины волны 450 нм и 620/630 нм.

Примечания к методике

Отрицательную, положительную контрольную сыворотку и контрольную сыворотку критического значения необходимо тестировать каждый раз для валидации результатов.

Обработка сыворотки/БАЛ

Все контрольные сыворотки: отрицательную (R3), положительную (R5) и сыворотку критического значения (R4) необходимо обрабатывать одновременно с образцами сыворотки/БАЛ.

1. Пипетируют по 300 мкл исследуемой сыворотки/БАЛ и контроля в отдельные полипропиленовые пробирки емкостью 1,5 мл.
2. Добавляют в каждую пробирку 100 мкл раствора для обработки образцов (R7).
3. Тщательно перемешивают содержимое пробирок, энергично встряхивая или с помощью устройства для перемешивания реагентов. Плотнo закройте пробирку во избежание ее открывания при нагревании.
4. **Использование термоблока**
Пробирки нагревают в термоблоке в течение 6 мин при 120°C. Пробирки помещают в термоблок только после достижения предписанной температуры (*).

ИЛИ

Использование водяной бани

Пробирки нагревают на водяной бане в течение **3 мин при 100°C (*)**. Пробирки помещают на водяную баню только после достижения предписанной температуры.

5. Осторожно извлекают горячие пробирки из термоблока или водяной бани и помещают в центрифугу. Центрифугируют при 10 000 g в течение 10 минут. Для обнаружения галактоманнанового антигена используют надосадочную жидкость.
6. Исследуют надосадочную жидкость следующим образом. После приготовления надосадочную жидкость можно слить и хранить при 2–8°C до 48 часов перед тестом. Если анализ показывает необходимость повторного теста, готовят другую аликвоту образца.

(*) Для успешного проведения теста необходимо строго соблюдать указанную температуру и время цикла, а также использовать рекомендуемые материалы.

Не доверяйте показаниям температурного датчика аппарата, убедитесь в ее соответствии спецификациям с помощью калиброванного термометра в пробирке с минеральным маслом: температура внутри пробирки в термоблоке должна составлять 120°C, на водяной бане – 100°C.

Постановка ИФА

Строго следуйте предложенному протоколу.

Соблюдайте Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP).

1. **Перед началом использования выдержите все реагенты при комнатной температуре (18–25°C) не менее чем 30 мин.**
2. Приготовьте рабочий раствор для промывки.
3. Подготовьте таблицу для идентификации образцов сыворотки/БАЛ и контроля на микропланшете. Одну лунку наполните отрицательной контрольной сывороткой (R3), две – контрольной сывороткой критического значения (R4), одну – положительной контрольной сывороткой (R5).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R5	O5	O13									
B	R4	O6										
C	R4	O7										
D	R3	O8										
E	O1	O9										
F	O2	O10										
G	O3	O11										
H	O4	O12										

4. Достаньте держатель планшета и стрипы с микролунками (R1) из пакета. Верните все неиспользуемые стрипы в пакет с влагопоглотителем и запечатайте его.
5. Перед использованием перемешайте содержимое флакона с конъюгатом (R6), перевернув его. Добавьте 50 мкл конъюгата (R6) в каждую лунку. Затем добавьте 50 мкл обработанной сыворотки/надосадочной жидкости БАЛ в каждую лунку, как указано выше. Не добавляйте сыворотку/БАЛ до конъюгата.
6. **Накройте планшет пленкой** или другим приспособлением во избежание испарения, убедившись в полном и герметичном закрытии.
7. Инкубируйте микропланшет в сухом инкубаторе в течение 90±5 минут при 37±1°C.
8. Снимите пленку с планшета. Слейте содержимое всех лунок в контейнер для отходов (содержащий гипохлорит натрия). Промойте планшет **в вошере 5 раз** (используя 800 мкл рабочего раствора для промывки). После последней промывки переверните микропланшет и аккуратно постучите им о фильтровальную бумагу для удаления остатков жидкости.

9. Быстро добавьте 200 мкл раствора хромогена ТМБ (R9) в каждую лунку, не подвергая действию яркого света.
10. Инкубируйте планшеты в темноте при комнатной температуре (18–25°C) в течение 30±5 минут. **На этом этапе клейкую пленку не используют.**
11. Добавьте 100 мкл останавливающего раствора (R10) в каждую лунку аналогично добавлению раствора хромогена ТМБ. Хорошо перемешайте.
12. Тщательно промойте дно каждой лунки.
13. Определите оптическую плотность каждой лунки при 450 нм (контрольный фильтр на 620/630 нм). Данные микропланшетов считывают в течение 30 минут после добавления останавливающего раствора.

11. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА (КРИТЕРИИ ВАЛИДАЦИИ)

Контроль критического значения. Оптическая плотность каждой контрольной сыворотки критического значения должна быть $\geq 0,300$ и $\leq 0,800$.

Положительный контроль. Коэффициент позитивности (I), для положительной контрольной сыворотки должен превышать 1,50.

$$I = \frac{\text{оптическая плотность положительного контроля (R5)}}{\text{средняя оптическая плотность контроля критического значения}} > 1,50$$

Отрицательный контроль. Коэффициент позитивности (I), для отрицательной контрольной сыворотки должен быть меньше 0,40.

$$I = \frac{\text{оптическая плотность отрицательного контроля (R3)}}{\text{средняя оптическая плотность контроля критического значения}} < 0,40$$

Несоблюдение любого из вышеуказанных условий для контроля приводит к недействительности теста и отбраковке результата. Оператор может решить повторить тест после пересмотра процедуры или связаться с производителем с просьбой о помощи. При повторном проведении теста используют новую аликвоту того же образца.

Пример расчета

Образец	Поглощение (оптическая плотность)
Отрицательная контрольная сыворотка (R3)	0,116
Контроль критического значения (R4)	0,513 0,533
Положительная контрольная сыворотка (R5)	1,834

Расчеты

Среднее значение для контроля критического значения

Для расчета средней оптической плотности для контроля критического значения (R4) сложите значения оптической плотности и разделите результат на 2.
 $(0,513 + 0,533) / 2 = 0,523$

Коэффициент позитивности (I) для отрицательного контроля

Для расчета коэффициента позитивности (I), для отрицательного контроля разделите оптическую плотность отрицательной контрольной сыворотки на среднюю оптическую плотность контроля критического значения.

$$I = 0,116 / 0,523 = 0,22$$

Коэффициент позитивности (I), для положительного контроля

Для расчета коэффициента позитивности (I), для положительного контроля разделите оптическую плотность положительной контрольной сыворотки на среднюю оптическую плотность контроля критического значения.

$$I = 1,834/0,523 = 3,51$$

Валидация

В вышеуказанном примере

- Оптическая плотность каждой контрольной сыворотки критического значения находится в пределах 0,300–0,800 (включительно) – результат достоверный.
- Коэффициент позитивности (I), для отрицательной контрольной сыворотки меньше 0,40 – результат достоверный.
- Коэффициент позитивности (I), для положительной контрольной сыворотки превышает 1,50 – результат достоверный.

Тест считается действительным, т. к. результаты для каждого контроля соответствуют критериям достоверности.

12. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Присутствие или отсутствие галактоманнанового антигена в исследуемом образце определяется путем расчета коэффициента позитивности (I), представляющего собой частное от деления оптической плотности каждого образца на среднюю оптическую плотность лунок с контрольной сывороткой критического значения.

Расчет средней оптической плотности контроля критического значения

Сложите значения оптической плотности обеих лунок с контрольной сывороткой критического значения (R4) и разделите сумму на 2.

Расчет коэффициента позитивности (I) для каждого исследуемого образца

Для каждого исследуемого образца рассчитывают следующий коэффициент:

$$I = \frac{\text{оптическая плотность образца}}{\text{средняя оптическая плотность контроля критического значения}}$$

Интерпретация коэффициента < 0,50 для сыворотки/БАЛ

Сыворотка/БАЛ с коэффициентом позитивности < 0,50 считается не содержащей галактоманнановый антиген.

Примечание. Отрицательный результат может означать содержание антигена ниже предела обнаружения, потому не исключает инвазивный аспергиллез. При подозрении на заболевание в сочетании с отрицательным результатом рекомендуется повторить тест.

Интерпретация коэффициента ≥ 0,50 для сыворотки/БАЛ

Сыворотка/БАЛ с коэффициентом позитивности ≥ 0,50 считается содержащей галактоманнановый антиген.

При положительном результате рекомендуется повторить тест с новой аликвотой того же образца (сыворотки/БАЛ).

Примечание. Поглощение ниже 0,000 может свидетельствовать об ошибке в методике или в работе оборудования, которую нужно изучить. Результат недействителен, требуется повторное исследование.

У пациентов с высоким риском рекомендуется проводить регулярный (2 раза в неделю) скрининг для ранней диагностики.

Примечание. Назначение набора Platelia Aspergillus Ag – обеспечить помощь в диагностике инвазивного аспергиллеза. Положительный результат теста Platelia Aspergillus Ag должен рассматриваться в комплексе с результатами других диагностических процедур, таких как культуральные микробиологические тесты, гистологическое исследование биоптата и рентгеновское исследование.

Пример расчета

Образец	Поглощение (оптическая плотность)
Отрицательная контрольная сыворотка (R3)	0,116
Контроль критического значения (R4)	0,513 0,533
Положительная контрольная сыворотка (R5)	1,834
Образец № 1	0,134
Образец № 2	0,436
Образец № 3	1,196

Расчеты

См. примеры расчетов для валидации контроля теста в разделе «Контроль качества (критерии валидации)».

Среднее значение для контроля критического значения

Для расчета средней оптической плотности для контроля критического значения (R4) сложите значения оптической плотности и разделите результат на 2.

$$(0,513+0,533)/2 = 0,523$$

Образец № 1

Для расчета коэффициента позитивности (I) для образца № 1 разделите его оптическую плотность на среднюю оптическую плотность контроля критического значения.

$$I = 0,134/0,523 = 0,26$$

В этом примере образец № 1 отрицателен, т. к. $0,26 < 0,50$.

Образец № 2

Для расчета коэффициента позитивности (I) для образца № 2 разделите его оптическую плотность на среднюю оптическую плотность контроля критического значения.

$$I = 0,436/0,523 = 0,83$$

В этом примере образец № 2 положителен, т. к. $0,83 \geq 0,50$.

Образец № 3

Для расчета коэффициент позитивности (I) для образца № 3 разделите его оптическую плотность на среднюю оптическую плотность контроля критического значения.

$$I = 1,196/0,523 = 2,29$$

В этом примере образец № 2 положителен, т. к. $2,29 \geq 0,50$.

Об интерпретации положительных результатов см. раздел 12.

13. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

1. Отрицательный результат для сыворотки и/или БАЛ не исключает инвазивного аспергиллеза. Образцы сыворотки пациентов с риском инвазивного аспергиллеза тестируют дважды в неделю.
2. При наличии галактоманнанового антигена необходимо соблюдение порядка проведения теста Platelia Aspergillus Ag и интерпретации результатов. Пользователю набора рекомендуется внимательно прочесть аннотацию перед проведением теста. В

- частности, необходимо строго соблюдать порядок проведения теста в отношении пипетирования образца и реагента, промывки микропланшета и времени инкубации.
3. Добавление образца или реагента иначе, чем указано в процедуре, может привести к ложноотрицательному результату. **При клиническом подозрении на инвазивный аспергиллез или ошибке в проведении теста рассмотрите возможность повторного исследования дополнительных образцов.**
 4. При неаккуратном обращении с планшетом или пипеткой возможна контаминация лунок отрицательных пациентов положительным контролем/образцами.
 5. Эффективность теста Platelia Aspergillus Ag не оценивалась у новорожденных. В европейской литературе описана большая частота возникновения ложноположительных результатов в образцах от новорожденных^{13, 15, 33, 34}.
 6. Эффективность теста Platelia Aspergillus Ag может быть снижена у больных хроническим гранулематозом и синдромом Жоба^{56, 58}.
 7. Применение антимикотиков у больных инвазивным аспергиллезом может снижать чувствительность теста Platelia Aspergillus Ag^{30, 31}.
 8. Эффективность теста Platelia Aspergillus Ag для плазмы и других типов образцов, например, мочи или СМЖ, не оценивалась.
 9. Эффективность теста Platelia Aspergillus Ag не оценивалась при определении результатов вручную и/или визуально.
 10. Другие роды грибов, например, *Penicillium*, *Alternaria* *paecilomyces*, *Geotrichum* и *Histoplasma* показали аналогичную реактивность с крысиными моноклональными антителами ЕВА-2, используемыми в тесте для обнаружения галактоманна грибов *Aspergillus*. При положительном результате теста в эндемических районах, включая часть США, рассмотрите возможность гистоплазмоза^{36, 50, 59}.
 11. Перекрестная реактивность с БАЛ, содержащими *Mycoplasma pneumoniae* или анестетики/лубриканты для анестезии глотки для аспирации, не оценивалась.
 12. Положительные реакции без клинических симптомов:
В случае раннего выявления галактоманнанового антигена в сыворотке или БАЛ до проявления клинических и/или рентгенологических симптомов необходимо рассмотреть следующее. Положительные результаты теста без клинических симптомов наблюдаются в большинстве случаев и являются истинно положительными для пациентов, которым в дальнейшем ставят диагноз подтвержденного/вероятного инвазивного аспергиллеза³⁰. Однако в некоторых случаях при интерпретации результатов необходимо рассмотреть особые факторы.
 - a. Особенно часто о положительных результатах теста при отсутствии клинических симптомов сообщалось у маленьких детей⁴⁴. Хотя некоторые из этих случаев могли на самом деле быть обусловлены циркулирующими антигенами грибка *Aspergillus*, большинство из них можно считать ложноположительными⁷.
 - b. В различных продуктах, особенно крупах, блюдах из зерновых, сливочных десертах, выявлено наличие галактофуранозы^{1, 27}. В отличие от грудного молока, коровье молоко часто содержит большие количества галактоманна¹³. Поэтому необходимо принять во внимание алиментарные факторы при интерпретации антигенемии у маленьких детей и, в общем, пациентов с поврежденным гематоинтестинальным барьером^{6, 13}. В этой группе пациентов интерпретировать случаи антигенемии без клинических симптомов следует еще осторожнее.
 - c. Сообщалось о положительных результатах теста на галактоманнан у пациентов, получающих пиперациллин/тазобактам. Также сообщалось о некоторых сериях/партиях пиперациллина/тазобакама, содержащих галактоманнановый антиген. Поэтому положительные результаты теста у пациентов, получающих пиперациллин/тазобактам, следует

интерпретировать с осторожностью и подтверждать с помощью других методов диагностики. Также сообщалось об обнаружении галактоманна в некоторых сериях амоксициллина при парентеральном применении клавулановой кислоты. Поэтому при интерпретации результатов теста необходимо принять во внимание лечение полусинтетическими β -лактамами^{1, 3, 32}.

Тем не менее, т. к. тест Platelia Aspergillus Ag способен выявлять галактоманновый антиген до появления клинических или рентгенологических симптомов, нельзя исключать вероятность инвазивного аспергиллеза. Поэтому пациенты с положительными результатами, принимавшие пиперациллин/тазобактам, требуют тщательного наблюдения.

- d. Положительные результаты при отсутствии клинических симптомов могут быть получены у пациентов, принимающих препараты, содержащие галактоманн, парентерально или внутрь (при повреждении гематоинтестинального барьера). Присутствие галактоманна в них часто объясняется использованием ферментирующих грибов. Однако положительный результат у человека не обнаруживается до тех пор, пока концентрация экзогенного галактоманна в сыворотке не достигнет или превысит порог обнаружения. Поэтому при подозрительном положительном результате в отсутствие клинических симптомов рекомендуется изучить препараты, которые принимает пациент, в частности их производственный процесс и происхождение сырья^{14, 41, 49}.

13. В нескольких исследованиях^{14, 41} сообщалось об обнаружении галактоманна в сыворотке и БАЛ при приеме PLASMA-LYTE™, поэтому прием этого препарата следует учитывать при интерпретации результатов теста.

14. Результаты исследования БАЛ пациентов без иммунодефицита с помощью теста Platelia Aspergillus Ag нужно интерпретировать с осторожностью³⁷.

15. Результаты, близкие к значению критического значения (0,5), интерпретируют с осторожностью, и они должны подтверждаться другими клиническими, рентгенологическими или лабораторными данными в пользу инвазивного аспергиллеза, т. к. интерпретация теста не включает в себя «серую зону».

16. Кроме того, результаты исследования БАЛ с помощью теста Platelia Aspergillus Ag в диапазоне 0,5–1,0 имеют меньшую прогностическую ценность, чем результаты, превышающие 1,0, поэтому результаты в диапазоне 0,5–1,0 необходимо проверить и подтвердить другими клиническими, рентгенологическими или лабораторными данными в пользу инвазивного аспергиллеза^{8, 17}.

14. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

I. СЫВОРОТКА

Ожидаемая распространенность инвазивного аспергиллеза среди пациентов непостоянна, сообщалось о значениях в диапазоне 5–20%^{10, 16}.

Следующие результаты были получены в ходе клинических исследований, проведенных среди детей (в возрасте 21 года и менее) в США и взрослых в Северной Америке.

Дети

В 3 исследовательских центрах США было проведено клиническое исследование 1954 образцов сыворотки от 129 детей (в возрасте 21 года и менее) с иммунодефицитом, имеющих высокий риск развития инвазивного аспергиллеза или диагноз подтвержденного/вероятного инвазивного аспергиллеза для определения эффективности теста Platelia Aspergillus Ag. Ниже показано распределение значений теста в этих группах.

Дети, без инвазивного аспергиллеза (контрольная группа)

Рис. 1.

Всего в 3 исследовательских центрах США было исследовано 1625* образцов сыворотки от 108 детей с иммунодефицитом для определения эффективности теста Platelia Aspergillus Ag. На графике показано распределение значений теста для этих образцов.



*Примечание. 80 образцов от 4 контрольных пациентов с положительной пробой на галактоманнанный антиген вследствие приема пиперациллина/тазобактама (Zosyn®) были исключены.

Дети с инвазивным аспергиллезом Рис. 2.

На диаграмме разброса показаны результаты пробы на галактоманнан для 249 образцов сыворотки от 17 пациентов, которым в ходе исследования был поставлен диагноз подтвержденного/вероятного инвазивного аспергиллеза по критериям EORTC/NIAD. Ожидалась положительная реакция не в каждой пробе сыворотки от каждого пациента. Ожидаемая распространенность инвазивного аспергиллеза среди пациентов непостоянна; сообщалось о значениях в диапазоне 5–20%^{10, 24}. В данном исследовании распространенность составила 13,6%.



Взрослые

В 3 исследовательских центрах Северной Америки было проведено клиническое исследование 1724 образцов сыворотки от 172 взрослых после пересадки костного мозга или больных лейкемией с инвазивным аспергиллезом или без него для определения эффективности теста Platelia Aspergillus Ag. Ниже показано распределение значений теста в этих группах.

Взрослые без инвазивного аспергиллеза (контрольная группа)

Рис. 3.

Всего в 3 исследовательских центрах Северной Америки было исследовано 1262 образцов сыворотки от 143 после пересадки костного мозга или больных лейкемией для определения эффективности теста Platelia Aspergillus Ag. На графике показано распределение значений теста для этих образцов.



Взрослые с инвазивным аспергиллезом

Рис. 4.

На диаграмме разброса показаны результаты пробы на галактотетраозу для 462 образцов сыворотки от 29 пациентов, которым в ходе исследования был поставлен диагноз подтвержденного/вероятного инвазивного аспергиллеза по критериям EORTC/NIAD. Ожидалась положительная реакция не в каждой пробе сыворотки от каждого пациента. Ожидаемая распространенность инвазивного аспергиллеза среди пациентов непостоянна; сообщалось о значениях в диапазоне 5–20%^{10, 24}. В данном исследовании распространенность составила 16,9%.



На следующих графиках приведены примеры пациентов без клинических признаков или симптомов инвазивного аспергиллеза (Aspergillus-отрицательных) и пациентов с подтвержденным/вероятным диагнозом инвазивного аспергиллеза (Aspergillus-положительных).

Рис. 5.

Отрицательные образцы

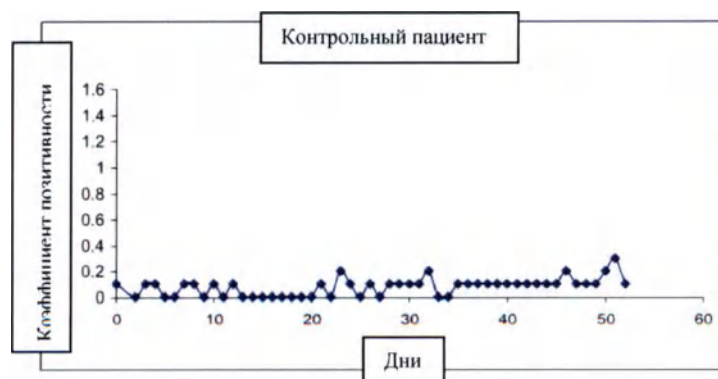


Рис. 6.
Положительные образцы



II. БАЛ

В США было проведено 2 исследования 449 образцов БАЛ от 178 реципиентов трансплантатов паренхиматозных органов и легких с инвазивным аспергиллезом и без него для определения эффективности теста Platelia Aspergillus Ag.

Из них 403 образца БАЛ – от 167 реципиентов трансплантатов паренхиматозных органов и легких без инвазивного аспергиллеза.

Кроме того, был проведен ретроспективный анализ образцов БАЛ от 99 поддающихся оценке гематологических пациентов группы высокого риска в ходе исследования за пределами США, включая 58 пациентов с подтвержденным/вероятным инвазивным аспергиллезом.

Ожидаемые значения для образцов БАЛ от реципиентов трансплантатов паренхиматозных органов и легких без инвазивного аспергиллеза приведены в таблице ниже. Представлены результаты для образцов от реципиентов с колонизацией плесневыми грибами и без.

Таблица 1

Ожидаемые значения для образцов

Реципиенты трансплантатов паренхиматозных органов и легких с инвазивным аспергиллезом

N = 403 БАЛ

Диагноз	№	Положительный, %	Отрицательный, %
Контроль без колонизации	341	11/341 (3,2%)	330/341 (96,8%)
Контроль с колонизацией	62	12/62 (19,4%)	50/62 (80,6%)
Всего контролей	403	23/403 (5,7%)	380/403 (94,3%)

Реципиенты трансплантатов паренхиматозных органов и легких без инвазивного аспергиллеза распределены в таблице ниже по типу трансплантата.

Таблица 2

Ожидаемые значения для образцов

Реципиенты трансплантатов паренхиматозных органов и легких без инвазивного аспергиллеза с указанием типа трансплантата

N = 403 БАЛ

Тип трансплантата	№	Положительный, %	Отрицательный, %
Сердце	28	3/28 (10,7%)	25/28 (89,3%)
Почки	25	3/25 (12,0%)	22/25 (88,0%)
Печень	23	1/23 (4,3%)	22/23 (95,7%)
Легкие	327	16/327 (4,9%)	311/327 (95,1%)

Всего контроля	403	23/403 (5,7%)	380/403 (94,3%)
-----------------------	-----	---------------	-----------------

Также проводили оценку ожидаемых значений среди 41 образца БАЛ от 41 гематологического пациента без инвазивного аспергиллеза, данные представлены в таблице ниже.

Таблица 3

Ожидаемые значения для образцов

Гематологические пациенты без инвазивного аспергиллеза

N = 41 БАЛ

Диагноз	№	Положительный, %	Отрицательный, %
Контроль	41	8/41 (19,5%)	33/41 (80,5%)

15. ОТДЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ

а) ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

а) Исследование воспроизводимости для сыворотки

Внутренняя воспроизводимость и воспроизводимость между тестами Platelia Aspergillus Ag определялись в исследовании с использованием набора из 6 пулированных образцов сыворотки (отрицательного, слабо положительного, 2 положительных, 2 сильно положительных) в 3 центрах в Северной Америке. Каждый образец панели, состоящей из 6 образцов был исследован по 3 раза в течение 3 дней в 2 центрах (всего 9 раз в каждом центре), после чего исследовался дважды в течение 3 дней в третьем центре (всего 6 раз). В каждом центре все прецизионные анализы проводил один оператор. Анализ данных проводили согласно нормам Института клинико-лабораторных стандартов (CLSI, ранее NCCLS – Национального комитета по клинико-лабораторным стандартам). В таблицах ниже приведены средняя оптическая плотность, среднее значение коэффициента позитивности, стандартное отклонение, процентный коэффициент вариации и воспроизводимость результатов для каждого образца панели.

Таблица 4
Центр 1

Образец	Отриц.		Слабо полож.		Полож. № 1		Полож. № 2		Сильно полож. №1		Сильно полож. №	
	Опт. плотн.	Коэф.позитивности	Опт. плотн.	Коэф.позитивности	Опт. плотн.	Коэф.позитивности	Опт. плотн.	Коэф.позитивности	Опт. плотн.	Коэф.позитивности	Опт. плотн.	Коэф.поз.
Количество исследований	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Сред.	0,052	0,09	0,445	0,74	0,702	1,17	0,931	1,563	1,227	2,06	2,887	4,83
Стандартное отклонение (внут. воспроизводимость) ¹	0,002	0,00	0,022	0,03	0,059	0,09	0,044	0,08	0,051	0,09	0,089	0,17
Коэфф. вариации	Н/Д	Н/Д	4,8%	4,4%	8,4%	7,6%	4,7%	5,1%	4,2%	4,4%	3,1%	3,6%
Стандартное отклонение (воспроиз. между тест-системами) ²	0,036	0,04	0,051	0,08	0,070	0,14	0,044	0,25	0,058	0,029	0,169	0,58
Коэфф. вариации	Н/Д	Н/Д	11,5%	10,4%	10,0%	11,6%	4,7%	15,7%	4,7%	14,3%	5,9%	11,9%

Центр 2

Образец	Отриц.		Слабо полож.		Полож. № 1		Полож. № 2		Сильно полож. №1		Сильно полож. №	
	Опт. плотн.	Коэф.позитивности	Опт. плотн.	Коэф.позитивности	Опт. плотн.	Коэф.позитивности	Опт. плотн.	Коэф.позитивности	Опт. плотн.	Коэф.позитивности	Опт. плотн.	Коэф.поз.
Количество исследований	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Сред.	0,040	0,10	0,280	0,70	0,364	0,89	0,602	1,49	0,801	2,01	1,361	3,43
Стандартное отклонение (внут. воспроизводимость) ¹	0,006	0,01	0,041	0,09	0,023	0,07	0,045	0,11	0,046	0,10	0,047	0,11
Коэфф. вариации	Н/Д	Н/Д	14,5%	13,0%	6,4%	7,6%	7,5%	7,1%	5,7%	4,8%	6,5%	3,2%
Стандартное отклонение (воспроиз. между тест-системами) ²	0,006	0,03	0,058	0,19	0,083	0,18	0,057	0,28	0,042	0,53	0,079	1,00
Коэфф. вариации	Н/Д	Н/Д	20,8%	27,0%	22,7%	19,8%	9,5%	18,7%	5,3%	26,5%	5,8%	29,2%

Центр 3

Образец	Отриц.		Слабо полож.		Полож. № 1		Полож. № 2		Сильно полож. №1		Сильно полож. № 2		Отриц. контрол	
	Опт. плотн.	Коэф. позитивности	Опт. плотн.	Коэф. позитивности	Опт. плотн.	Коэф. позитивности	Опт. плотн.	Коэф. позитивности	Опт. плотн.	Коэф. позитивности	Опт. плотн.	Коэф. позитивности	Опт. плотн.	Коэф. позитивности

Количество исследований	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	3	3
Сред.	0,049	0,10	0,388	0,81	0,652	1,36	0,830	1,73	1,158	2,41	2,378	4,96	0,059	0,12
Стандартное отклонение (внут. воспроизводимость) ¹	0,003	0,01	0,009	0,02	0,082	0,17	0,068	0,14	0,094	0,20	0,126	0,25	Н/Д	Н/Д
Кoeff. вариации	Н/Д	Н/Д	2,4%	2,4%	12,5%	12,2%	8,2%	8,2%	8,1%	8,2%	5,3%	5,1%	Н/Д	Н/Д
Стандартное отклонение (воспроиз. между тест-системами) ²	0,012	0,03	0,078	0,13	0,068	0,15	0,104	0,25	0,082	0,15	0,111	0,34	Н/Д	Н/Д
Кoeff. вариации	Н/Д	Н/Д	20,0%	15,8%	10,5%	11,1%	12,5%	14,3%	7,1%	6,2%	4,7%	6,8%	Н/Д	Н/Д

Н/Д – не применимо.

¹NCCLS EP5-A, т. 19, № 2, стр. 24, формула (C2).

²NCCLS EP5-A, т. 19, № 2, стр. 25, формулы (C3) и (C4).

б) Исследование воспроизводимости для БАЛ

Внутренняя воспроизводимость и воспроизводимость между тест-системами теста Platelia Aspergillus Ag определялись в исследовании с использованием набора из 6 пулированных образцов сыворотки (отрицательного, слабо положительного, 2 положительных, 2 сильно положительных) в 3 центрах (2 центрах клинических исследований в США и 1 внутреннем центре). Каждый из 4 экземпляров в наборе, а также контроли были исследованы по 2 раза дважды в течение 5 дней (всего 120 раз в каждом центре). В каждом центре все прецизионные анализы проводили два оператора. Анализ данных проводили согласно нормам Института клинико-лабораторных стандартов (CLSI, ранее NCCLS – Национального комитета по клинико-лабораторным стандартам). В таблицах ниже приведены средняя оптическая плотность, среднее значение коэффициента позитивности, стандартное отклонение, процентный коэффициент вариации и воспроизводимость результатов для каждого образца.

Таблица 5. Сводка по центрам

Значение		Отрицательный		Сильно отрицательный		Слабо положительный		Средне положительный		Положительный контро.	
		N=60		N=60		N=60		N=60		N=60	
		Опт.плотность	Коэф. позитивности	Опт.плотность	Коэф. позитивности	Опт.плотность	Коэф. позитивности	Опт.плотность	Коэф. позитивности	Опт.плотность	Коэф. позитивности
Среднее значение		0,121	0,29	0,214	0,50	0,375	0,88	0,575	0,135	1,580	3,72
Внутренняя воспроизводимость	Стандартное отклонение	Н/Д	Н/Д	0,037	0,103	0,035	0,078%	0,029	0,067	0,111	0,265
	Коэффициент вариации, %	Н/Д	Н/Д	17,4%	20,5%	9,3%	8,9%	5,0%	5,0%	7,0%	7,1%
Воспроизводимость между наборами Platelia Aspergillus Ag	Стандартное отклонение	Н/Д	Н/Д	0,042	0,095	0,061	0,122	0,070	0,138	0,190	0,438
	Коэффициент вариации, %	Н/Д	Н/Д	19,6%	18,9%	16,2%	13,9%	12,2%	10,2%	12,0%	11,8%

Б) ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ

Исследования по оценке возможного влияния медицинских факторов, не связанных с инвазивным аспергиллезом, проводили с использованием 1 лота набора Platelia Aspergillus Ag. С помощью набора тестировали следующий перечень сывороток общим числом 151.

Таблица 6

Патология	Число протестированных образцов	Число положительных результатов
Ревматоидный фактор	10	0
Антинуклеарные антитела	10	0
Гипергаммаглобулинемия по IgG	10	0
Гипергаммаглобулинемия по IgM	10	0
Рак*	11	0
Цирроз невирусного происхождения (первичный билиарный; алкогольный; лекарственный)	10	0
Множественный трасфузии	10	0
Многочисленные роды	10	0
Вирусный гепатит А	10	0
Вирусный гепатит С	10	0
Краснуха	10	0
Цитомегаловирус	10	0
Сифилис (РПР+)	10	0
Токсоплазмоз	10	0
Микоплазмоз	10	0

*По одной пробе от больных раком мочевого пузыря, молочной железы (2), толстого кишечника, эндометрия, легких, простаты, почек и сквамозным раком (3).

В) КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинические исследования в Северной Америке

1. ОБРАЗЦЫ СЫВОРОТКИ

Клинические исследования чувствительности, специфичности и прогностического значения теста Platelia Aspergillus Ag проводились у детей (в возрасте 21 года и менее) в 3 центрах в США и у взрослых в 3 центрах в Северной Америке. Были исследованы 1954 образца сыворотки от 129 детей и 1724 образца сыворотки от 172 взрослых из следующих групп:

- без симптомов инвазивного аспергиллеза (контрольная группа);
- с **вероятным** инвазивным аспергиллезом;
- с подтвержденным инвазивным аспергиллезом.

Кооперативная исследовательская группа по инвазивным микозам (IFICG) Европейской организации по исследованию и лечению рака (EORTC) и Группа по исследованию микозов (MSG) Национального института аллергических и инфекционных заболеваний (NIAID) в 2002 г. определили критерии диагностики инвазивного аспергиллеза у пациентов с гемобластомами или после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

А) Дети

Результаты исследования анализировали с точки зрения чувствительности теста Platelia Aspergillus Ag у 17 детей с иммунодефицитом и подтвержденным/вероятным инвазивным аспергиллезом в 3 центрах.

Таблица 7

Диагноз	Количество пациентов	Чувствительность	95% доверительный интервал
Подтвержденный аспергиллез	8	44,4% (4/9)	18,9-73,3%
Вероятный аспергиллез	9	62,5% (5/8)	30,6-86,3%
Подтвержденный и Вероятный аспергиллез	17*	52,9% (9/17)	31,0-73,8%

*Примечание. У 8 из 17 пациентов выявлен отрицательный результат пробы на галактоманнанный антиген Aspergillus. Все 8 пациентов получали несколько противогрибковых препаратов. Одновременный прием нескольких антимикотиков может снизить чувствительность теста у некоторых пациентов с инвазивным аспергиллезом³¹.

Б) Взрослые

В 3 центрах проводилось исследование чувствительности теста Platelia Aspergillus Ag у 29 пациентов после пересадки костного мозга или страдающих лейкемией с диагностированным подтвержденным/вероятным инвазивным аспергиллезом.

Таблица 8

Диагноз	Количество пациентов	Чувствительность	95% доверительный интервал
Подтвержденный аспергиллез	11	81,8% (9/11)	52,3-94,9%
Вероятный аспергиллез	18	77,8% (14/18)	54,8-91,0%
Подтвержденный и Вероятный аспергиллез	29	79,3% (23/29)	61,6-90,2%

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

А) Дети

Специфичность у детей

В 3 центрах проводилось исследование специфичности теста Platelia Aspergillus Ag у 108* детей с иммунодефицитом без симптомов инвазивного аспергиллеза (контрольная группа).

Таблица 9

Центр	Количество пациентов	Специфичность	95% доверительный интервал
1	44	86,4% (38/44)	73,3-93,6%
2	59	86,4% (51/59)	75,5-93,0%
3	5	100% (5/5)	56,6-100%
Всего центров	108	87,0% (94/108)	79,4-92,1%

***Примечание.** 4 пациента с положительным результатом теста на галактоманнанный антиген вследствие приема пиперациллина/тазобактама были исключены.

Специфичность для образцов от детей

В 3 центрах проводилось исследование специфичности теста Platelia Aspergillus Ag в 1625* образцах от 108 детей с иммунодефицитом без симптомов инвазивного аспергиллеза (контрольная группа).

Таблица 10

Центр	Количество образцов	Специфичность	95% доверительный интервал
1	794	98,9% (785/794)	97,9-99,4%
2	731	97,8% (715/731)	96,5-98,6%
3	100	100% (100/100)	96,3-100%
Всего центров	1625	98,5% (1600/1625)	97,7-99,0%

***Примечание.** 80 образцов от 4 пациентов с положительным результатом теста на галактоманнанный антиген вследствие приема пиперациллина/тазобактама были исключены.

Б) Взрослые

Специфичность у взрослых

В 3 центрах проводилось исследование специфичности теста Platelia Aspergillus Ag у 143 пациентов после пересадки костного мозга или страдающих лейкемией без симптомов инвазивного аспергиллеза (контрольная группа).

Таблица 11

Центр	Количество пациентов	Специфичность	95% доверительный интервал
1	28	78,6% (22/28)	60,5-89,8%
2	77	93,4% (71/77)	84,0-96,4%
3	39	89,5% (34/38)	75,9-95,8%
Всего центров	143	88,8% (127/143)	82,9-93,0%

Специфичность для образцов взрослых

В 3 центрах проводилось исследование специфичности теста Platelia Aspergillus Ag в 1262 образцах от 143 пациентов после пересадки костного мозга или страдающих лейкемией без симптомов инвазивного аспергиллеза (контрольная группа).

Таблица 12

Центр	Количество образцов	Специфичность	95% доверительный интервал
1	349	98,0% (342/349)	95,9-99,0%
2	560	98,6% (552/560)	97,2-99,3%
3	353	98,9% (349/353)	97,1-99,6%
Всего центров	1262	98,5% (1243/1262)	97,0-99,0%

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Для пациентов в этом исследовании были проанализированы положительные и отрицательные прогностические значения. Положительные и отрицательные

прогностические значения рассчитывали исходя из средней встречаемости в 13,6% у детей и 16,9% у взрослых в этом исследовании.

А) Дети

Встречаемость 13,6%

Положительное значение: 39,1%	прогностическое	95% доверительный интервал: 22,2-59,2%
Отрицательное значение: 92,2%	прогностическое	95% доверительный интервал: 95,3-96,0%

Б) Взрослые

Встречаемость

Положительное значение: 59,0%	прогностическое	95% доверительный интервал: 43,4-72,9%
Отрицательное значение: 95,5%	прогностическое	95% доверительный интервал: 90,5-97,9%

Сообщалось об ожидаемой встречаемости инвазивного аспергиллеза 5–20%^{10, 24}. Для групп пациентов с низким уровнем встречаемости положительные и отрицательные прогностические значения рассчитывали повторно, используя значение встречаемости 5%.

А) Дети

Расчетная встречаемость 5%

Положительное значение: 17,6%	прогностическое	95% доверительный интервал: 6,5-39,8%
Отрицательное значение: 97,2%	прогностическое	95% доверительный интервал: 92,1-99,1%

Б) Взрослые

Расчетная встречаемость 5%

Положительное значение: 27,2%	прогностическое	95% доверительный интервал: 13,7-46,7%
Отрицательное значение: 98,8%	прогностическое	95% доверительный интервал: 95,4-99,7%

II. ХАРАКТЕРИСТИКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЛЯ ОБРАЗЦОВ БАЛ

Чувствительность и специфичность теста Platelia Aspergillus Ag изучались в США в ходе 2 исследований 116 образцов БАЛ от 62 реципиентов трансплантатов паренхиматозных органов и 333 образцов от реципиентов легких с инвазивным аспергиллезом и без него, а также в 1 исследовании 99 образцов от 99 оценке гематологических пациентов группы высокого риска с инвазивным аспергиллезом и без него.

А) Чувствительность

Чувствительность оценивалась у реципиентов трансплантатов паренхиматозных органов и легких, а также гематологических пациентов с инвазивным аспергиллезом согласно критериям EORTC/MSG.

I. Реципиенты трансплантатов паренхиматозных органов с инвазивным аспергиллезом

Из 116 образцов от 62 реципиентов трансплантатов паренхиматозных органов в исследовании чувствительность оценивали у 5 испытуемых с диагностированным инвазивным аспергиллезом (см. таблицу ниже).

Таблица 13

Чувствительность теста Platelia Aspergillus Ag

Реципиенты трансплантатов паренхиматозных органов с подтвержденным/вероятным инвазивным аспергиллезом (распределение по числу пациентов)

Диагноз	Кол-во	Коэффициент позитивности $\geq 0,5$	Чувствительность	95% доверительный интервал
Подтвержденный аспергиллез	2	2	2/2(100%)	34,2-100%
Вероятный аспергиллез	3	3	3/3 (100%)	43,8-100%
Подтвержденный и Вероятный аспергиллез	5	5	5/5 (100%)	56,5-100%

Таблица 14

Чувствительность теста Platelia Aspergillus Ag

Реципиенты трансплантатов паренхиматозных органов с подтвержденным/ вероятным инвазивным аспергиллезом (распределение по типу трансплантата)

Тип трансплантата	Кол-во	Коэффициент позитивности $\geq 0,5$	Чувствительность	95% доверительный интервал
Сердце	1	1	1/1 (100%)	20,6-100%
Почки	3	3	3/3 (100%)	43,8-100%
Печень	1	1	1/1 (100%)	20,6-100%
Всего	5	5	5/5 (100%)	56,5-100%

II. Реципиенты легких с инвазивным аспергиллезом

Из 333 образцов от 116 реципиентов легких в исследовании чувствительность оценивали у 6 испытуемых с диагностированным инвазивным аспергиллезом (см. таблицу ниже).

Таблица 15

Чувствительность теста Platelia Aspergillus Ag

Реципиенты легких с подтвержденным/ вероятным инвазивным аспергиллезом (распределение по числу пациентов)

Диагноз	Кол-во	Коэффициент позитивности $\geq 0,5$	Чувствительность	95% доверительный интервал
Подтвержденный аспергиллез	2	1	1/2 (50,0%)	9,4-90,6%
Вероятный аспергиллез	4	3	3/4 (75,0%)	30,0-65,4%
Подтвержденный и Вероятный аспергиллез	6	4	4/6 (66,7%)	30,0-90,3%

III. Гематологические пациенты с инвазивным аспергиллезом

Чувствительность теста также оценивалась в 58 образцах от 58 гематологических пациентов с инвазивным аспергиллезом (см. таблицу ниже) методом ретроспективного анализа образцов БАЛ от гематологических пациентов группы высокого риска с помощью

теста *Platelia Aspergillus Ag*. Опубликованные данные исследования оценивали для определения характеристик эффективности ИФА-теста *Platelia Aspergillus Ag* для БАЛ²⁹.

Таблица 16

Подтвержденный/Вероятный инвазивный аспергиллез у гематологических пациентов

Диагноз	Кол-во	Коэффициент позитивности $\geq 0,5$	Чувствительность	95% доверительный интервал
Подтвержденный аспергиллез	31	31	31/31 (100%)	89,0-100%
Вероятный аспергиллез	27	26	26/27 (96,3%)	81,7-99,3%
Подтвержденный и Вероятный аспергиллез	58	57	57/58 (98,3%)	90,8-99,7%

Специфичность

Специфичность оценивалась в 98 образцах БАЛ от 57 реципиентов трансплантатов паренхиматозных органов и 305 образцах БАЛ от 110 реципиентов легких без инвазивного аспергиллеза (см. таблицу ниже). Результаты приведены для образцов от реципиентов, продемонстрировавших рост колоний плесневых грибов или его отсутствие.

Таблица 17

Специфичность в образцах

Реципиенты трансплантатов паренхиматозных органов и легких без инвазивного аспергиллеза

N = 403 образца БАЛ

Диагноз	Кол-во	Коэффициент позитивности $\geq 0,5$	Отрицательный, %	95% доверительный интервал
Контроль без колонизации	341	330	330/341 (96,8%)	94,3-98,2%
Контроль с колонизацией	62	50	50/62 (80,6%)	69,1-88,6%
Всего контроля	403	380	380/403 (94,3%)	91,6-96,2%

Специфичность в образцах БАЛ реципиентов трансплантатов паренхиматозных органов и легких без инвазивного аспергиллеза приведена с указанием типа трансплантата в таблице 18.

Таблица 18

Специфичность в образцах

Реципиенты трансплантатов паренхиматозных органов и легких без инвазивного аспергиллеза (распределение по типу трансплантата)

N = 403 образца БАЛ

Тип трансплантата	Кол-во	Коэффициент позитивности $\geq 0,5$	Отрицательный	95% доверительный интервал
Сердце	28	25	25/28 (89,3%)	72,8-96,3%
Почки	25	22	22/25 (88,0%)	70,0-95,8%
Печень	23	22	22/23 (95,7%)	79,0-99,2%

Легкие	327	311	311/327 (95,1%)	92,2-97,0%
Всего	403	380	980/403 (94,3%)	91,6-96,2%

Специфичность также оценивалась в 41 образце БАЛ от 41 гематологического пациента без инвазивного аспергиллеза (см. таблицу ниже).

Таблица 19

Специфичность в образцах

Гематологические пациенты без инвазивного аспергиллеза

N = 41

Диагноз	Кол-во	Коэффициент позитивности $\geq 0,5$	Отрицательный	95% доверительный интервал
Контрольная группа пациентов	41	33	33/41 (80,5%)	66,0-89,8%

16. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Ansorg, R., R. Van Den Boom, and P.M. Rath. 1997. Detection of Aspergillus galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses* 40 : p. 353-7.
2. Ascioglu, S., J. H. Rex, B. De Pauw, J. E. Bennett, J. Bille, F. Crokaert, D. W. Denning, J. P. Donnelly, J. E. Edwards, Z. Erjavec, D. Fiere, O. Lortholary, J. Maertens, J. F. Meis, T. F. Patterson, J. Ritter, D. Selleslag, P. M. Shah, D. A. Stevens and T. J. Walsh. 2002. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin.Infect.Dis.* 34: p. 7-14.
3. Aubry, A., R. Porcher, J. Bottero, S. Touratier, T. Leblanc, B. Brethon, P. Rousselot, E. Raffoux, J. Menotti, F. Derouin, P. Ribaud and A. Sulahian 2006. Occurrence and Kinetics of False-Positive Aspergillus GalactomannanTest Results following Treatment with S-Lactam Antibiotics in Patients with Hematological Disorders. *J. Clin. Microbiol.* 44: p. 389-394.
4. Barnes P. D. and K. A. Marr. 2007 Risks, diagnosis and outcomes of invasive fungal infections in haemotopoeitic stem cell transplant recipients. *Brit. Journ. Haemotol.* 139: p. 519-531.
5. Becker M. J., E. J. Lugtenburg, J. J. Cornelissen, C. V.D. Schee, H. C. Hoogsteden and S. D. Marie. 2003 Galactomannan detection in computerized tomography-based broncho-alveolar lavage fluid and serum in haemotological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Br. J. Haemotol.* 121(3): p. 448-457.
6. Blijevens, N. M., J. P. Donnelly, J. F. Meis, P. E. Verweij, and B. E. De Pauw. 2002 Aspergillus galactomannan antigen levels in allogeneic haemotopoietic stem cell transplant recipients given total parenteral nutrition. *Transpl. Infect. Dis.* 4: p. 64-65.
7. Chambon-Pautas, C., J. M. Costa, M.T. Chaumette, C. Cordonnier, and S. Bretagne. 2001 Galactomannan and polymerase chain reaction for the diagnosis of primary digestive aspergillosis in a patient with acute myeloid leukaemia. *J. Infect.* 43: p. 213-214.
8. Clancy C., R. A. Jaber, H. L. Leather, J. R. Wingard, B. Staley, J. L. Wheat, C. Cline, K. H. Rand, D. Schain, M. Baz and M. H. Nyugen. 2007 Bronchoalveolar Lavage Galactomannan in Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis among Solid-Organ Transplant Recipients. *J. Clin. Microbiol.* 45(6): p. 1759-1765.
9. De Repentigny, L., L. Kaufman, G. T. Cole, D. Kruse, J. P. Latge, and R. C. Matthews. 1994. Immunodiagnosis of Invasive Fungal Infections. *J Med Vet Mycol* 32: p. 239-252.

10. **Denning, D. W.** 1998. Invasive Aspergillosis. *Clin Infect. Dis.* 26: p. 781-803.
11. **Desai R, L.A. Ross and J. A. Hoffman** Poster AAA 2008. The Role of Bronchoalveolar Lavage Galactomannan Assay in the Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Pediatric Populations.
12. **Erjavec, Z. and P. E. Verweij.** 2002. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. *Drug Resist. Updat.* 5: p.3-10.
13. **Gangneux, J., D. Lavarde, S. Bretagne, C. Guiguen and V. Gandemer.** 2002. Transient *Aspergillus* antigenaemia: think of milk. *Lancet.* 359(9313):1251.
14. **Hage, C. A., J. M. Reynolds, M. Durkin, L. J. Wheat, K. S. Knox.** 2007. Plasmalyte as a Cause of false-positive results for *Aspergillus* galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid. *J. Clin. Microbiol.* 45: p. 676-677.
15. **Herbrecht, R., V. Letscher-Bru, C. Oprea, B. Lioure, J. Waller, F. Campos, O. Villard, K. L. Liu, S. Natarajan-Ame, P. Lutz, P. Dufour, J. P. Bergerat, and E. Candolfi.** 2002. *Aspergillus* galactomannan detection in the diagnosis of Invasive Aspergillosis in cancer patients. *J Clin. Oncol.* 20: p.1898-1906.
16. **Herbrecht, R., D. Denning, T. Patterson, J. Bennett, R. Greene, J. Oestmann, W. Kern, K. Marr, P. Ribaud, O. Lortholary, R. Sylvester, R. Rubin, J. Wingard, P. Stark, C. Durand, D. Caillot, E. Thiel, P. Chandrasekar, M. Hodges, H. Schlamm, P. Troke, B. DePauw.** 2002. Voriconazole Versus Amphotericin B for Primary Therapy of Invasive Aspergillosis. *N Engl J Med.* 347, 6: p. 408-415.
17. **Hussain S., D.L. Paterson, S. M. Studer, M. Crespo, J. Pilewski, M. Durkin, J.L. Wheat, B. Johnson, L. McLaughlin, C. Bentsen, K. McCurry and N. Singh.** 2007. *Aspergillus* Galactomannan Antigen in the Bronchoalveolar Lavage Fluid for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Lung Transplant Recipients. *Transplantation* 83(10): p. 1330-1336.
18. **Hussain S., C. J. Clancy, M.H. Nyugen, S. Swartzentruber, H. Leather, A. M. LeMonte, M.M. Durkin, K. S. Knox, C. A. Hage, C. Bentsen, N. Singh, J.R. Wingard and L.J. Wheat.** 2008 Performance Characteristics of the Platelia *Aspergillus* AG for detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in bronchoalveolar lavage fluid. *Clin. Vaccine Immunol.* 15(12) : p. 1760-1763.
19. **Khan ZU, Ahmad S, and Theyyathel AM.** 2008 Detection of *Aspergillus fumigatus*-specific DNA, (1-3)-beta-d-glucan and galactomannan in serum and bronchoalveolar lavage specimens of experimentally infected rats. *Mycoses*; 51: p. 129-35.
20. **Klont R.R., M.A.S.H. Mennink-Kersten and P. E. Verweij.** 2004 Utility of *Aspergillus* Antigen Detection in Specimens Other than Serum Specimens. *Clin. Infect. Diseases.* 39: p. 1467-74.
21. **Knox KS, Rose AS, and Hage CA.** 2007 Rapid Fungal Diagnosis: The Utility of Bronchoalveolar Lavage for Pneumocystis and Endemic Mycoses. *Current Fungal Infection Reports*; 1: p. 153-8.
22. **Kwak EJ and Nyugen MH.** 2008 Galactomannan Detection in Bronchoalveolar Lavage Fluid. *Current Fungal Infection Reports*; 2: p.206-213.
23. **Latge, J. P.** 1995. Tools and trends in the detection of *Aspergillus fumigatus*. *Curr Top Med Mycol* 6: p. 245-281.
24. **Latge, J. P.** 1999 *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 12[2], 310-50.
25. **Latge, J. P., H. Kobayashi, J. P. Debeaupuis, M. Diaquin, J. Sarfati, J. M. Wieruszkeski, E. Parra, J. P. Bouchara, and B. Fournet.** 1994. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 62: p. 5424-5433.
26. **Letscher-Bru, V., A. Cavalier, E. Pernot-Marino, H. Koenig, D. Eyer, J. Waller and E. Candolfi.** 1998. Recherche d'antigene galactomannane aspergillaire circulant par

- PlateliaAspergillus: antigenemias positivas persistentes en l'absence d'infection. *J. Med. Mycol.* 8:p. 112-113.
27. **Maertens, J., J. Verhaegen, H. Demuynck, P. Brock, G. Verhoef, P. Vandenberghe, J. Van Eldere, L. Verbist, and M. Boogaerts. 1999.** Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive Aspergillosis. *J.Clin. Microbiol.* 37: p. 3223-3228.
 28. **Maertens, J., J. Verhaegen, K. Lagrou, J. Van Eldere, and M. Boogaerts. 2001.** Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for Invasive Aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood* 97: p. 1604-1610.
 29. **Maertens J., V. Maertens, K. Theunissen, W. Meersseman, P. Meersseman, S. Meers, E. Verbeken, G. Verhoef, J. V. Eldere and K. Lagrou. 2009.** Bronchoalveolar Lavage Fluid Galactomannan for the Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Patients with Hematologic Diseases. *Clin. Infect. Diseases.* 49: 1688-93.
 30. **Marr K. A., S. A. Balajee, L. McLaughlin, M. Tabouret, C. Bentsen and T.J. Walsh. 2004.** Detection of Galactomannan Antigenemia by Enzyme Immunoassay for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis: Variables That Affect Performance. *J. Infect. Dis.* 190 :641-9
 31. **Marr K. A., M. Laverdiere, A. Gugel and W. Leisenring. 2005.** Antifungal therapy decreases sensitivity of the Aspergillus galactomannan enzyme immunoassay. *Clin. Infect. Dis* 40: p. 1762-9.
 32. **Mattei, D., D. Rapezzi, N. Mordini, F.Cuda, C. Lo Nigro, M. Musso, A. Arnelli, S. Cagnassi, and Gallamini. 2004.** False-positive Aspergillusgalactomannan enzyme-linked immunosorbent assay results in vivo during amoxicillin-clavulanic acid treatment. *J. Clin. Microbiol.* 42: p. 5362-5363.
 33. **Mennink-Kersten M. A. S. H., D. Ruegebrink, R. Klont, A. Warris, H. J. M. Op den Camp and P. Verweij. 2005** Bifidobacterial Lipoglycan as a New Cause for False-Positive Platelia Aspergillus Enzyme Immunoabsorbent Assay Reactivity. *J. Clin. Microbiol.* 43(8): 3925-3931.
 34. **Meersseman W., K. Lagrou, J. Maertens, A. Wilmer, G. Hermans, S. Vanderschueren, I. Spriet, E. Verbeken and E. V. Wijngaerden. 2008** galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid. *Am. J. Respi. Crit. Care Med* 177: p. 27-34.
 35. **Musher B., D. Fredericks, W. Leisenring, S. A. Balajee, C. Smith and K. Marr. 2004** Aspergillus galactomannan Enzyme Immunoassay and Quantitative PCR for Diagnosis of Invasive Aspergillosis with Bronchoalveolar Lavage Fluid. *J. Clin. Microbiol.* 42(12): p. 5517-5522.
 36. **Nareddy, S., P. H. Chandrasekar. 2008.** False-positive Aspergillus galactomannan (GM) assay in histoplasmosis. *J. Infection* 56: p. 80-81.
 37. **Nguyen MH, R. Jaber, H.L. Leather, J. R. Wingard, B. Staley, L. J. Wheat, C. L. Cline, M. Baz, K.H. Rand and C. J. Clancy. 2007** Use of bronchoalveolar lavage to detect galactomannan for diagnosis of pulmonary aspergillosis among nonimmunocompromised hosts. *J Clin Microbiol*; 45:2787-92.
 38. **Patterson D. L. and N. Singh. 1999.** Invasive Aspergillosis in Transplant Recipients. *Medicine.* 78(2): p. 123-38.
 39. **Pauw B.D., Walsh T. J., Donnelly J. P., Stevens D.A., Edwards J. E., Calandra T., Pappas P. G., Maertens J., Lortholary O., Kauffman C. A., Denning D.W., Patterson T.F., Maschmeyer G., Bille J., Dismukes W.E., Herbrecht R., Hope W. W., Kibbler C.C., Kulberg B. J., Marr K. A., Munoz P., Odds F. C., Perfect J. R., Restrepo A., Ruhnke M., Segal M., Segal B. H., Sobel J. D., Sorell T.C., Viscoli C., Wingard J.R., Zaoutis T. and J.E. Bennett. 2008** Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal

Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG Consensus Group). Clin. Infectious Disease 46, p. 1813-1821.

40. **Penack O., P. Rempf, B. Graf, I. W. Blau and E. Thiel. 2008** Aspergillus galactomannan testing in patients with long-term neutropenia: implications for clinical management. Ann Oncol. 19(5): p. 984-9, Epub 2008.
41. **Racil, Z., I. Kocmanova, M. Lengerova, J. Winterova, J. Mayer. 2007.** Intravenous PLASMA-LYTE as a Major Cause of False-Positive Results of PlateliaAspergillusTest for galactomannan Detection in Serum. J. Clin. Microbiol. 45(2): p. 3141-3142.
42. **Salonen J., O-P. Lehtonen, M-R Terasjarvi and J. Nikoskelainen. 2000.** Aspergillus Antigen in Serum, Urine and Bronchoalveolar Lavage Specimens of Neutropenic Patients in Relation to Clinical Outcome. Scand J. Infec. Dis. 32: p.485-490.
43. **Sanguinetti M., B. Posteraro, L. Pagano, G. Pagliari, L. Fianchi, L. Mele, M. L. Sorda, A. Franco and G. Fadda. 2003.** Comparison of Real-Time PCR, Conventional PCR, and galactomannanAntigen Detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples from Hematology Patients for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. J. Clin. Microbiol. 41(8): p.3922-3925.
44. **Siemann M., M. Koch-Dorfler and M. Gaude 1998.** False-positive results in premature infants with the Platelia Aspergillus sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay. Mycoses. 41(9-10): 373-7.
45. **Stynen, D., A. Goris, J. Sarfati, and J. P. Latge. 1995.** A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with Invasive Aspergillosis. J.Clin. Microbiol. 33: p. 497-500.
46. **Stynen, D., J. Sarfati, A. Goris, M. C. Prevost, M. Lesourd, H. Kamphuis, V. Darras, and J. P. Latge. 1992.** Rat monoclonal antibodies against Aspergillus galactomannan. Infect.Immun. 60: p. 2237-2245.
47. **Sulahian, A., F. Boutboul, P. Ribaud, T. Leblanc, C. Lacroix, and F. Derouin. 2001.** Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of Invasive Aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. Cancer 91: p. 311-318.
48. **Sulahian, A., M. Tabouret, P. Ribaud, J. Sarfati, E. Gluckman, J. P. Latge, and F. Derouin. 1996.** Comparison of an enzyme immunoassay and latex agglutination test for detection of galactomannan in the diagnosis of Invasive Aspergillosis. Eur.J Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15: p. 139145.
49. **Surmont ,I., W. Stockman. 2007.** Gluconate-containing intravenous solutions: Another cause of false-positive galactomannan assay reactivity. J. Clin. Microbiol. 45: p. 1373.
50. **Swanink, C. M., J. F. Meis, A. J. Rijs, J. P. Donnelly, and P. E. Verweij. 1997.** Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting Aspergillus galactomannan. J Clin. Microbiol. 35: p. 257-260.
51. **Upton A., A. Gugel, W. Leisenring, A. Limaye, B. Alexander, R. Hayden and K. Marr. 2005.** Reproducibility of Low galactomannan Enzyme Immunoassay Index Values Tested in Multiple Laboratories. J. Clin. Microbiol, 43: p 4796-4800.
52. **Verdaguer V., T. J. Walsh, W. Hope and K. Cortez. 2007** galactomannan antigen detection in the diagnosis of invasive aspergillosis. Expert Rev. Mol. Diagn. 7(1):p. 21-32.
53. **Verweij, P. E., E. C. Dompeling, J. P. Donnelly, A. V. Schattenberg, and J. F. Meis. 1997.** Serial monitoring of Aspergillus antigen in the early diagnosis of Invasive Aspergillosis. Preliminary investigations with two examples. Infection 25: p. 86-89.
54. **Verweij, P. E. and J. F. Meis. 2000.** Microbiological diagnosis of Invasive Fungal Infections in transplant recipients. Transpl.Infect.Dis. 2: p. 80-87.
55. **Verweij, P. E., D. Stynen, A. J. Rijs, B. E. de Pauw, J. A. Hoogkamp -Korstanje, and J. F. Meis. 1995.** Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex

- latex agglutination test for diagnosing Invasive Aspergillosis in immunocompromised patients. *J. Clin. Microbiol.* 33: p. 1912-1914.
56. **Verweij, P. E., C. M. Weemaes, J. H. Curfs, S. Bretagne, J. F. Meis. 2000.** Failure to detect circulating Aspergillus markers in a patient with chronic granulomatous disease and Invasive Aspergillosis. *J Clin. Microbiol.* 38: p. 3900-3901.
 57. **Verweij P., J-P Latge, A. J. J. M. Rijs, W. J. G. Melchers, B. E. D. Pauw, J. A. A. Hoogkamp-Korstanje. 1995** Comparison of Antigen Detection and PCR Assay Using Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosing Invasive Pulmonary Aspergillosis in Patients Receiving Treatment for Hematological Malignancies. *J. Clin. Microbiol.* 33(12): p. 3150-3153.
 58. **Walsh T. J., R.L. Schaefele, T. Sein, J. Gea-Banacloche, M. Bishop, N. Young, R. Childs, J. Barrett, H. L. Malech, and S.M. Holland. 2002.** Reduced expression of galactomannanantigenemia in patients with Invasive Aspergillosis and chronic granulomatous disease or Job's syndrome. Abstracts of the 40th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America. Arlington, VA. P. 105 ; Abstr. 345.
 59. **Wheat, L. J., E. Hackett, M. Durkin, P. Connolly, R. Petraitiene, T. J. Walsh, K. Knox, C. Hage. 2007.** Histoplasmosis-associated cross-reactivity in the Bio-Rad Platelia Aspergillus enzyme immunoassay. *Clin. Vaccine Immunol.* 14 (5): p. 638-40.
 60. **Wheat J.L., A. M. Monte, M.M. Durkin, S.L. Swartzentruber, K.K. Knox, C.A. Hage, C. Bentsen, S. Husain, N. Singh, C.J. Clancy, M.H. Nyugen AAA 2008.** Poster Detection of Aspergillus galactomannan in BAL in the Platelia Aspergillus AG, as performed at MiraVista Diagnostics. <http://www.miravistalabs.com> Site verified June 9, 2008.
 61. **Wheat J. and T.J. Walsh. 2008** Diagnosis of Invasive Aspergillosis by galactomannan Antigenemia Detection using an enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 27:245-51.
 62. **Yeo, S. F. and B. Wong. 2002.** Current Status of Nonculture Methods for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *Clin.Microbiol.Rev.* 15: p. 465-484.

- (EN) • This product contains human or animal components. Handle with care.
- (RU) • Этот продукт содержит компоненты человеческого или животного происхождения. Обращаться с осторожностью.



H314 - H317

P280 - P305+P351+P338 - P301+P330+P331 -
P303+P361+P353 - P333+P313 - P501

(EN)

Danger

Causes severe skin burns and eye damage. May cause an allergic skin reaction.

Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. IF SWALLOWED: rinse mouth. Do NOT induce vomiting. IF ON SKIN (or hair): Remove/Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower. If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

(RU)

Опасно!

Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждение глаз. Может вызывать аллергическую реакцию кожи.

Наденьте защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / защиту для лица. ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА. Осторожно промойте глаза водой, в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы, если они надеты и это легко сделать. Продолжайте промывать глаза. ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: Прополощите рот. НЕ вызывайте рвоту. ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (ВОЛОСЫ): Снимите/удалите немедленно всю загрязненную одежду. Промойте участок кожи водой. При возникновении раздражения или появления сыпи Обратитесь к врачу. Утилизируйте содержимое/упаковку в соответствии с местными / региональными / национальными / международными правилами.

Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette France
Tel. : +33 (0) 1 47 95 60 00
Fax.: +33 (0) 1 47 41 91 33
www.bio-rad.com



2013/10
881115

 ООО ЦИПМИ  INFO@CIRMI.RU  WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

17. ПРИЛОЖЕНИЕ Информация для обращения медицинского изделия на территории РФ.

Набор реагентов Platelia Aspergillus Ag для выявления галактоманнанового антигена Aspergillus в сыворотке и бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) методом иммуноферментного анализа.

Дополнение к Разделу 10 инструкции по применению:

- Выходной контроль качества набора определяется на:
- контрольная панель положительных сывороток (Panel de Controle Aspergillus Ag), содержащей галактоманнановый антиген Aspergillus, как процент образцов, определенных набором как положительный и составляет 100%.
- контрольная панель отрицательных сывороток (Panel de Controle Aspergillus Ag), не содержащих галактоманнановый антиген Aspergillus Aspergillus, как процент от образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

17.1 Транспортирование

Изделие следует перевозить в оригинальной упаковке производителя, защищающей продукцию от внешних воздействий, на всех видах транспорта в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

При проведении погрузочно-разгрузочных работ и транспортировании следует строго выполнять требования манипуляционных знаков, нанесенных на упаковке и транспортной таре.

При несоблюдении условий транспортирования и хранения медицинское изделие не подлежит использованию!

17.2 Хранение

Хранение наборов должно осуществляться, в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С, в холодильниках или холодильных камерах, в течение всего срока годности.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках при температуре от 2 до 8 °С, в холодильниках или холодильных камерах, в течение 8 недель.

17.3 Утилизация

Утилизация изделия должна производиться в соответствии с требованиями локального, регионального и национального законодательства.

Все образцы и материалы, использующиеся и образующиеся при выполнении исследований, в том числе реагенты с истекшим сроком годности, следует утилизировать в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 как потенциально инфицированные медицинские отходы (класс Б).

17.4 Гарантии

Производитель гарантирует соответствие характеристик изделия заявленным в эксплуатационной документации при условии применения в соответствии с инструкцией и по назначению, предусмотренному производителем.

По всем вопросам, для получения технической консультации, рекламациям и поддержки следует обращаться к уполномоченному представителю производителя на территории РФ:

ООО «Био-Рад Лаборатории»

Адрес: 105064, г. Москва, Нижний Сусальный переулок, дом 5, строение 5А.

Телефон: +7 (495) 721-14-04.

E-mail: diag_support_rcis@bio-rad.com

<http://www.bio-rad.com>

Стр. 1

Штамп:

Био-Рад,
3 Бульвар Раймона Пуанкаре, 92430,
Марн-ла-Кокетт - Франция

Стр. 2

Штамп: Сильвия Фернез, Начальник нормативно-правового отдела

Подпись

Штамп:

Био-Рад,
3 Бульвар Раймона Пуанкаре, 92430,
Марн-ла-Кокетт - Франция

Штамп:

свидетельствую верность подписи *г-жи Сильвии Фернез*, проставленной в
ПАРИЖЕ, 23.07.2019

Это засвидетельствование подписи не подтверждает верность и подлинность
подписанного документа. Нотариус не несет ответственности за содержание такого
документа.

/подпись/

Печать: г-н Ксавьера ФАВРИ, нотариус в нотариальной конторе KL, Париж

Перевод данного текста с английского и французского языков на русский язык сделан мной, переводчиком Алексеевым Алексеем Александровичем.

[Handwritten signature]

Российская Федерация

Город Москва

Тридцатого июля две тысячи девятнадцатого года

Я, Мартынова Наталья Андреевна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Акимов Глеба Борисовича, свидетельствую подлинность подписи переводчика Алексеева Алексея Александровича.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 77/09-н/77-2019- *59-3614*

Взыскано государственной пошлины (по тарифу): 100 руб.

Уплачено за оказание услуг правового и технического характера: 200 руб.

[Handwritten signature]
Всего прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью 40 лист(а)(ов)
ВРИО нотариуса *[Handwritten signature]*

Н.А. Мартынова

